

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Pediatría



**IMPACTO CLÍNICO DE LA MANIPULACIÓN DEL
INÓCULO EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE
PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE DONANTE
FAMILIAR EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON
HEMOPATÍAS MALIGNAS**

Tesis doctoral presentada por:
Blanca Herrero Velasco

Directores de la Tesis:
Dr. Miguel Ángel Díaz Pérez
Dr. Antonio Pérez Martínez

Madrid 2015



EL DR. MIGUEL ÁNGEL DÍAZ PÉREZ, JEFE DE SECCIÓN DEL SERVICIO DE ONCO-HEMATOLOGÍA Y TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO DEL HOSPITAL INFANTIL UNIVERSITARIO NIÑO JESÚS DE MADRID Y EL DR. ANTONIO PÉREZ MARTÍNEZ ,PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA DE LA UAM Y MÉDICO ADJUNTO DE ONCOHEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PAZ

C E R T I F I C A N: Que Dña. **BLANCA HERRERO VELASCO**, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección un trabajo de investigación titulado ***“Impacto clínico de la manipulación del inóculo en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de donante familiar en pacientes pediátricos con hemopatías malignas”***, para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Dicho trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser sometido a lectura y discusión ante el Tribunal.

En Madrid, a 23 de Septiembre de 2015

Fdo. Miguel Ángel Díaz Pérez

Fdo. Antonio Pérez Martínez

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Ángel Díaz Pérez por creer en este trabajo desde el principio y conseguir que esta tesis me entusiasmara tanto como a él y, sobre todo, por enseñarme *“que los árboles no deben impedirme ver el bosque”*.

Al Dr. Antonio Pérez Martínez por todas sus aportaciones y por creer en mi capacidad de trabajo, incluso más que yo misma.

A la Dra. Marta González Vicent, por estar siempre dispuesta a ayudarme en cualquier cosa que necesitara.

A Julia Ruiz Pato, por ayudarme con la obtención de datos durante este trabajo.

A mi familia, porque sin vosotros y vuestro apoyo incondicional no podría haber hecho esta tesis; así que también es vuestra.

A mi hija Lola, por no tener en cuenta todo el tiempo que esta tesis me ha robado de estar con ella.

*A mi abuelo, por ayudarme a ser quien soy
A Lola, por enseñarme lo que de verdad importa*

ÍNDICE

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	15
1. HISTORIA DEL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS	17
2. HLA (<i>Histocompatibility Lekocyte Antigen</i>)	18
2.1. Tipificación del HLA	
3. FUENTE DE OBTENCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS	20
3.1. Médula ósea	
3.2. Sangre periférica	
3.3. Sangre de cordón umbilical	
4. ACONDICIONAMIENTO	22
4.1. Acondicionamientos mieloablativos	
4.2. Acondicionamientos de intensidad reducida	
5. MANIPULACIÓN. ELIMINACIÓN DE LINFOCITOS T DEL INÓCULO	24
5.1. Justificación de la manipulación	
5.2. Ventajas e inconvenientes de la eliminación de linfocitos T	
5.3. Estrategias de eliminación de linfocitos T del inóculo	
5.4. Estrategias de manipulación más utilizadas actualmente	
5.5. Selección CD34 ⁺ en pacientes pediátricos	
6. QUIMERISMO	29
6.1. Tipos de quimerismo postrasplante	
6.2. Estudio del quimerismo	
7. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED	32
7.1. Fisiopatología de la Enfermedad de Injerto Contra Huésped	
7.2. Enfermedad de Injerto Contra Huésped Aguda	
7.3. Enfermedad de Injerto Contra Huésped Crónica	
7.4. Reclasificación de la Enfermedad de Injerto Contra Huésped	
8. EFECTO INJERTO CONTRA LEUCEMIA	47
8.1. Infusión de linfocitos del donante	
9. RECONSTITUCIÓN INMUNE POSTRASPLANTE	52
9.1. Linfocitos T	
9.2. Células Natural Killer	
9.3. Linfocitos B	
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO	57
III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	61
1. JUSTIFICACIÓN	63
2. OBJETIVOS	64

IV. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS	65
1. TIPO DE ESTUDIO	67
2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DEL ESTUDIO	68
2.1. Criterios de inclusión	
2.2. Criterios de exclusión	
3. CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES. JUSTIFICACIÓN DE COHORTES	69
4. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	70
4.1. Características epidemiológicas de los pacientes	
4.2. Características de la enfermedad de los pacientes	
5. CARACTERÍSTICAS DEL PROCEDIMIENTO	72
5.1. Características generales	
5.2. Acondicionamiento	
5.3. Fuente de progenitores	
6. PROCEDIMIENTO DE MANIPULACIÓN. SELECCIÓN POSITIVA DE CÉLULAS CD34 ⁺ MEDIANTE CliniMACS System®	74
6.1. Tecnología MACS para selección celular	
6.2. Explicación del CliniMACS system®	
6.3. Proceso de selección de células CD34 ⁺ mediante CliniMACS system®	
6.4. Citometría de flujo durante el procedimiento de selección CD34 ⁺	
7. CARACTERÍSTICAS DEL INÓCULO	81
8. INJERTO HEMATOPOYÉTICO	82
9. INFUSIÓN DE LINFOCITOS DEL DONANTE	83
9.1. Condiciones para la administración de ILD	
9.2. Número de pacientes con ILD	
9.3. Número de ILD por paciente	
10. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED	84
10.1. Clasificación del tipo de EICH	
10.2. Estadificación de la gravedad de la EICH	
11. QUIMERISMO	85
12. RECONSTITUCIÓN INMUNE	86
13. RECOGIDA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	87
13.1. Recogida de datos	
13.2. Análisis estadístico	
IV. RESULTADOS	89
1. ESTUDIO RECAÍDA POSTRASPLANTE	91
1.1. Descripción de la recaída postrasplante	
1.2. Cinética de recaída postrasplante	
1.3. Análisis de recaída postrasplante autólogo	
1.4. Análisis de recaída postrasplante alogénico	
1.5. Análisis de la recaída postrasplante alogénico según EICH crónica	

2. ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED AGUDA	105
2.1. Descripción de la EICH aguda	
2.2. Descripción de la EICH aguda tras la infusión de linfocitos del donante	
2.3. Análisis de EICH aguda grave	
3. ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED CRÓNICA	110
3.1. Descripción de la EICH crónica	
3.2. Análisis de EICH crónica extensa	
4. ESTUDIO DE MORTALIDAD	115
4.1. Descripción de la mortalidad	
5. ESTUDIO DE LA MORTALIDAD RELACIONADA CON EL TRASPLANTE	116
5.1. Descripción de la MRT	
5.2. Análisis de MRT en el trasplante alogénico no manipulado	
6. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE EVENTOS	120
6.1. Descripción de la SLE	
6.2. Análisis de SLE en el trasplante alogénico	
7. QUIMERISMO POSTRASPLANTE ALOGÉNICO	128
8. RECONSTITUCIÓN INMUNE POSTRASPLANTE ALOGÉNICO	129
8.1. Descripción de la reconstitución inmune postrasplante alogénico	
8.2. Reconstitución inmune y probabilidad de recaída	
9. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS DOS ESTRATEGIAS DE TRASPLANTE ALOGÉNICO DEL ESTUDIO	133
9.1. Comparación de la probabilidad de recaída en los dos tipos de trasplante alogénico en función de la fase de enfermedad	
9.2. Comparación de la SLE en los dos tipos de trasplante alogénico en función de la fase de enfermedad	
9.3. Relación entre EICH y EICL en los dos tipos de trasplante alogénico	
 V. DISCUSIÓN	 141
 VI. CONCLUSIONES	 155
 VII. BIBLIOGRAFÍA	 159
 VIII. ANEXO	 171
1. LISTA DE ABREVIATURAS	173
2. TABLAS ANEXAS	175

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. HISTORIA DEL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Los primeros experimentos sobre trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) los realizó Thomas en ratones y perros. Fueron Barnes y Louis en 1956 los primeros que introdujeron la idea de que el trasplante de médula ósea podría tener un efecto terapéutico antitumoral, ya que observaron efecto antileucemia al trasplantar células del bazo en modelos murinos. En 1957 se realizó el primer trasplante en humanos, que fue realizado por el Dr. Thomas⁽¹⁾ en el Fred Hutchison Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA, al infundir células hematopoyéticas en tres pacientes con leucemia aguda, aunque todos los pacientes fallecieron. Paralelamente Mathé realizó trasplantes alogénicos de médula ósea para tratar a pacientes que sufrieron una radiación accidental, algunos sobrevivieron con recuperación autóloga⁽²⁾. Los primeros intentos iniciales de trasplante fracasaron hasta que se demostró la importancia de similitud en los antígenos de histocompatibilidad entre donante y receptor. Se ha considerado a Donall Thomas el padre del trasplante, y por ello, recibió un premio nobel en 1992. En 1977, Thomas y su grupo publicaron una serie de 100 pacientes con leucemia aguda avanzada, tratados con irradiación corporal total y ciclofosfamida, que recibieron un trasplante alogénico de un hermano HLA idéntico. Algunos de estos pacientes se curaron de su enfermedad⁽³⁾.

La existencia de un complejo mayor de histocompatibilidad fue descrita por el Dr. Snell en el trasplante hematopoyético en ratones⁽⁴⁾. Este complejo era el que condicionaba, por un lado, la posibilidad de rechazo del trasplante y, por otro, una reacción inmune de las células del injerto hematopoyético del donante frente a los antígenos tisulares del huésped, originando un síndrome o enfermedad secundaria. El Dr. Billingham estableció en la década de los 60 los postulados de la Enfermedad de Injerto Contra Huésped (EICH)⁽⁵⁾.

Mathé fue el primero en afirmar que las células inmunocompetentes del donante eran capaces de eliminar las células de la leucemia; a este fenómeno lo denominó efecto injerto contra leucemia (EICL)⁽⁶⁾.

Desde el inicio del conocimiento de la inmunidad que conlleva el trasplante alogénico de progenitores, todos los esfuerzos han ido encaminados a conseguir separar la enfermedad de injerto contra huésped del efecto injerto contra leucemia.

2. HLA (*Histocompatibility Lekocyte Antigen*)

El sistema mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) fue descrito por primera vez por Snell⁽⁴⁾ en ratones para explicar la base génica del rechazo del injerto. El MCH humano se denomina HLA (del inglés, *Histocompatibility Lekocyte Antigen*). En la especie humana, el complejo mayor de histocompatibilidad se descubrió al buscar en un sujeto moléculas de superficie celular que fueran reconocidas como extrañas por otro sujeto. Dausset⁽⁷⁾ y Van Rood⁽⁸⁾ descubrieron que en la sangre de personas que habían recibido múltiples transfusiones sanguíneas, o que habían recibido un trasplante renal, se detectaban anticuerpos circulantes que reconocían células de la sangre o del riñón de los donantes, y constataron además, que las mujeres multíparas tenían anticuerpos circulantes que reconocían células paternas.

El MHC se localiza en los humanos en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) y ocupa un gran segmento de ADN, que contiene más de cuatro megabases. Las moléculas codificadas por los genes de esta región son fundamentales, entre otras funciones, para la inmunidad innata y el sistema inmune antígeno-específico^(9,10).

Probablemente la región del HLA sea la que presenta más polimorfismos de todo el genoma conocido. Cada cadena está codificada por una secuencia del ADN situada en una posición fija sobre el cromosoma (*locus*). Las variantes de la secuencia de ADN de un determinado locus se denominan alelos. Cada individuo posee dos alelos de cada locus, uno procedente del padre y otro de la madre. El grupo de alelos del MHC presente en cada cromosoma se llama haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad. Los alelos de diferentes locus no se asocian al azar, sino que existen desequilibrios de ligamiento, es decir determinados alelos se agrupan dando lugar a haplotipos frecuentes.

Las moléculas del HLA se expresan en la superficie celular donde presentan péptidos a los linfocitos T como antígenos de superficie. Mientras que cada alelo de MHC puede presentar miles de distintos péptidos, el receptor del linfocito T reconoce el péptido solo si se lo presenta la misma molécula de MHC que lo hizo durante el “priming”. Este concepto se denomina restricción de clase (*MHC Restriction*).

El complejo de histocompatibilidad se divide en tres principales regiones, la región de HLA de clase I (contiene genes para HLA-A, HLA-B y HLA-C), la región de HLA clase II (contiene HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP) y entre medias de ambas la región del HLA de clase III (una zona densa con genes que incluyen aquellos que codifican factores de complemento y factores de necrosis tumoral, TNF, del inglés *Tumoral Necrosis Factor*).

Las moléculas de clase I se expresan en todas las células nucleadas y en las plaquetas. Están constituidas por una cadena α y una β_2 microglobulina. Las moléculas de clase I presentan antígenos al linfocito T $CD8^+$, por lo que inducen una respuesta citotóxica.

Las moléculas de clase II normalmente las expresan solo células del sistema inmune (células dendríticas, linfocitos B y macrófagos). Están compuestas por dos glicoproteínas transmembrana, una α y una β . Son moléculas que presentan antígeno al linfocito T $CD4^+$ e inducen activación de células colaboradoras.

2.1. TIPIFICACIÓN DEL HLA

La tipificación de los genes HLA consiste en determinar cuáles, de todas las variantes conocidas para un locus, están presentes en un individuo.

Hasta hace algunos años la tipificación HLA se realizaba con técnicas serológicas, utilizando sueros específicos contra los distintos antígenos del HLA. Mediante este método se detectan los antígenos presentes en la membrana de los linfocitos estudiados.

En la actualidad, la tipificación se realiza utilizando técnicas de biología molecular, estudiando los genes del individuo. Es un método más específico y permite diferenciar alelos que eran imposibles de distinguir serológicamente. La tipificación por biología molecular de los genes HLA puede realizarse tanto con baja resolución (se diferencian los mismos alelos que nivel serológico) como con alta resolución (se define a nivel alélico cada *loci* estudiado).

3. FUENTE DE OBTENCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Inicialmente los progenitores hematopoyéticos se obtenían de la médula ósea. Con el uso de los factores estimulantes de colonias se comenzó a utilizar sangre periférica como fuente alternativa y en los 90 también se inició el uso de la sangre de cordón umbilical para los trasplantes de progenitores hematopoyéticos.

3.1. MÉDULA ÓSEA

La médula ósea fue la fuente original para la obtención de células progenitoras hematopoyéticas y, durante mucho tiempo, la única utilizada para la realización de trasplantes hematopoyéticos. Por eso en muchos casos, al trasplante de progenitores hematopoyéticos se le sigue denominando trasplante de médula, independientemente de la fuente utilizada para la obtención de los progenitores. La extracción de médula ósea se hace en quirófano, mediante un procedimiento de recogida (en inglés *harvest*), con el donante dormido. Consiste en realizar a través de uno o dos puntos cutáneos de cada cresta iliaca posterior, múltiples punciones repetidas (entre 100 y 200) variando la dirección y la profundidad para obtener médula ósea. Lo ideal es que el contenido de cada aspiración sea inferior a 5 ml para evitar la contaminación con sangre periférica. El volumen del material extraído no puede ser superior a 15-20 ml/Kg de peso del donante. Para obtener una buena celularidad, lo ideal sería obtener un volumen de 20-30 ml/Kg de peso del receptor. La médula ósea siempre es filtrada por gravedad a través de filtros convencionales de transfusión (200-500 micrones). Habitualmente se realiza un lavado de hematíes de la aféresis de médula ósea extraída con hidroetil almidón antes de la infusión.

3.2. SANGRE PERIFÉRICA

El recuento de células progenitoras hematopoyéticas en sangre periférica en condiciones normales es muy pequeño. Se consideran células progenitoras aquellas que expresan el antígeno de superficie CD34. En condiciones normales, la proporción normal de células CD34⁺ en sangre periférica equivale al 0,05% de los leucocitos.

Gracias a la utilización de factores de crecimiento hematopoyéticos se consigue aumentar el número de las células progenitoras en el torrente sanguíneo. De los factores de crecimiento, el más utilizado es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, del inglés *Granulocyte Colony Stimulating Factor*). Si con la utilización de G-CSF no se consigue una buena movilización se utiliza otro fármaco, el Plerixafor, cuyo mecanismo de acción favorece que los progenitores salgan del compartimento medular a la sangre periférica. En población pediátrica hay distintos estudios sobre movilización de progenitores de sangre periférica con factores de crecimiento⁽¹¹⁻¹³⁾.

Tras la movilización con factores de crecimiento se comprueba que hay una proporción adecuada de células progenitoras en sangre periférica y se procede a la obtención de las mismas. Esto se realiza mediante un separador celular, preferiblemente de flujo continuo, con dos vías de acceso vascular (una de entrada y otra de salida) en el donante. Se selecciona un programa para obtención de células mononucleadas (entre las que se encuentran las células CD34⁺), devolviendo al donante el resto de la sangre. Se procesa un volumen equivalente a dos o tres veces la volemia del donante. El objetivo de la aféresis es obtener entre 2-5x10⁶ células CD34⁺/Kg de peso del receptor.

Existen distintos tipos de separadores celulares. La CobeSpectra® resulta muy útil en pacientes pediátricos porque permite calcular la volemia del donante basándose en datos de peso, altura y género. En pacientes menores de 25 Kg de peso el sistema de cálculo que utiliza la máquina de aféresis no se puede emplear; se calcula la volemia con dos fórmulas: si el paciente pesa menos de 9 Kg la volemia es igual a 90 ml por cada Kg de peso del paciente y si el paciente pesa más de 9 Kg la volemia es igual a 80 ml por cada Kg de peso del paciente.

Esta fuente de progenitores es actualmente la más utilizada; se utiliza en la práctica totalidad de trasplantes autólogos y en muchos trasplantes alogénicos. Existen distintos motivos para que cada vez se utilice esta fuente: no se necesita un quirófano, no precisa anestesia general y los donantes suelen preferirla. Una de las ventajas con respecto a la médula ósea es que con el uso de sangre periférica se consigue una recuperación leucoplaquetar más rápida⁽¹⁴⁾. El uso de sangre periférica como fuente de progenitores está asociada a un aumento de la aparición de EICH crónica, pero no hay diferencias en cuanto a EICH aguda.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

Desde el año 2000 hay distintos estudios sobre la utilización de sangre periférica como fuente de progenitores en pacientes pediátricos, también utilizando donantes pediátricos. Se ha confirmado que es una técnica segura, incluso cuando los donantes también son población pediátrica⁽¹⁷⁻²¹⁾, con buenos resultados clínicos⁽²²⁻²⁴⁾.

3.3. SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Se utiliza la sangre de cordón umbilical desde el año 1988 para la realización de trasplantes alogénicos de donantes no emparentados⁽²⁵⁾. Desde entonces, el trasplante de sangre de cordón umbilical ha evolucionado de forma importante⁽²⁶⁾, siendo una buena alternativa cuando el paciente carece de donante compatible. La sangre del cordón umbilical posee progenitores hematopoyéticos, pero el volumen del que se dispone es limitado, por lo que la cantidad total de células progenitoras es pequeña. Se obtiene la sangre del cordón a través de extracción por la vena umbilical tras la expulsión de la placenta (alumbramiento) y se recoge la sangre en una bolsa con anticoagulante. Se estudia la viabilidad celular, la presencia de enfermedades genéticas e infecciones y se realiza un estudio del HLA previo a su congelación. Entre las ventajas que aporta el uso de sangre de cordón umbilical, hay que destacar que el procedimiento de recogida es relativamente sencillo, no tiene riesgo para los donantes (ni para la madre ni para el recién nacido), se reduce la probabilidad de transmisión de enfermedades infecciosas (en particular citomegalovirus, CMV) y además proporciona la capacidad de tener estudiada y tipificada la muestra, y conservarla congelada, preparada para su uso inmediato. Entre los inconvenientes, en ocasiones el menor número de células progenitoras (por el escaso volumen que se recoge) puede condicionar una recuperación hematológica postrasplante más tardía⁽²⁷⁾ y un aumento de rechazo o fallo de injerto. En pacientes pediátricos la sangre de cordón umbilical se utiliza como fuente de progenitores hematopoyéticos⁽²⁸⁻³⁰⁾.

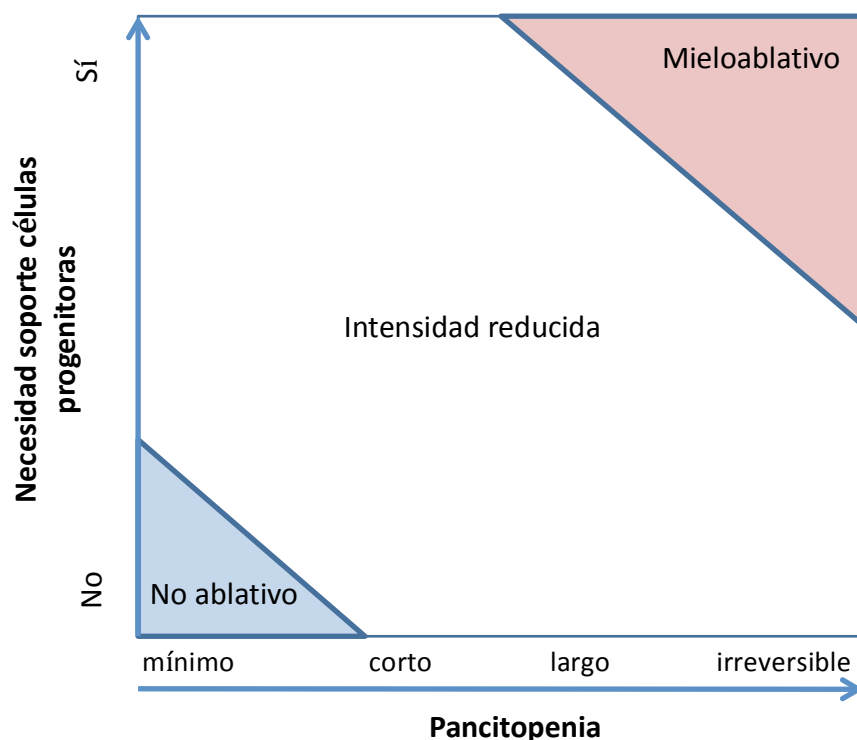
4. ACONDICIONAMIENTO

El término acondicionamiento hace referencia a la condición, a la preparación previa del paciente antes de recibir un trasplante. Englobamos dentro del término acondicionamiento a los distintos tratamientos (quimioterapia o radioterapia) que va a recibir el paciente los días previos a la infusión de progenitores.

Según la intensidad de la pancitopenia que causen los acondicionamientos y la posibilidad de recuperación autóloga espontánea, se han establecido distintas nomenclaturas para los acondicionamientos⁽³¹⁾:

- Mieloablativos: son aquellos regímenes que causan pancitopenia irreversible (o casi irreversible). Precisan soporte con células hematopoyéticas para recuperación de la hematopoyesis en la médula ósea y prevenir la mortalidad relacionada con la aplasia.
- No mieloablativos: son regímenes que producen mínima pancitopenia y que no precisarían soporte para recuperar la hematopoyesis con células progenitoras.
- Intensidad reducida: se denominan así los regímenes de acondicionamiento que no son mieloablativos, que basan su esquema en la inmunosupresión más que en la toxicidad medular.

Figura 1. Tipos de Acondicionamiento



4.1. ACONDICIONAMIENTOS MIELOABLATIVOS

El acondicionamiento mieloablativo fue el que primero se desarrolló. Se basa en el uso de quimioterapia sola o asociada al uso de radioterapia, previa al trasplante de progenitores hematopoyéticos. Uno de los esquemas de tratamiento más utilizados fue el propuesto por el Dr. Santos en los 80 combinando el uso de busulfán con ciclofosfamida⁽³²⁾.

Sus objetivos son:

- Reducir o eliminar el clon maligno con altas dosis de quimioterapia.
- Crear “espacio” en la médula para permitir que las células del donante puedan injertar.
- Producir una inmunosupresión en el receptor suficiente para permitir un injerto estable y una reconstitución inmune a partir de la células del donante.

Este tipo de acondicionamiento se ha acompañado en ocasiones de una alta morbilidad a corto y a largo plazo para los pacientes: produce toxicidad endocrina, cardiopulmonar, aparición de segundos tumores, desarrollo de síndromes mielodisplásicos y/o aparición de EICH grave.

En niños, el uso de irradiación corporal total produce efectos importantes a largo plazo^(33,34), como retraso de crecimiento y problemas endocrinos múltiples, por lo que se está omitiendo, cada vez más, el uso de radioterapia para el acondicionamiento de pacientes pediátricos.

4.2. ACONDICIONAMIENTOS DE INTENSIDAD REDUCIDA

Con el objetivo de intentar disminuir la toxicidad de un acondicionamiento tan intensivo como el mieloablativo, que en pacientes de edad avanzada o con patologías orgánicas graves excluía la realización de un trasplante, surgieron otros tipos de acondicionamiento como los de intensidad reducida.

Los objetivos de los acondicionamientos de intensidad reducida son⁽³⁵⁾:

- Prevenir el rechazo o el fallo del injerto
- Conseguir mantener la hematopoyesis estable del donante
- Permitir el efecto injerto contra leucemia del injerto
- Disminuir los efectos, a corto y a largo plazo, que producían los acondicionamientos mieloablativos

El Dr. Slavin,⁽³⁶⁾ fue el pionero en el uso de estos acondicionamientos de intensidad reducida basados en el uso de fludarabina como inmunosupresor. La fludarabina es un análogo de las purinas que actúa inhibiendo la síntesis del ADN. La fludarabina ha constituido la base de los acondicionamientos de intensidad reducida, por su potente efecto inmunosupresor con poca toxicidad hematológica asociada. Se han utilizado esquemas combinando la fludarabina con irradiación corporal total o con distintos quimioterápicos como busulfán, ciclofosfamida o citarabina.

Los acondicionamientos de intensidad reducida tienen como característica una recuperación hematopoyética más rápida (normalmente menos de 28 días) y condicionar un estado de quimerismo mixto postrasplante que puede utilizarse como plataforma para el uso de infusiones de linfocitos del donante (ILD) para prevenir el rechazo y para potenciar el EICL, intentando separarlo de la EICH.

Existen ya numerosos trabajos en los que se ha utilizado este tipo de acondicionamientos en pacientes pediátricos^(35,37,38). El motivo de utilizar acondicionamientos de intensidad reducida en los pacientes pediátricos no radica en que estos pacientes presenten comorbilidades importantes, sino en el hecho de que estos pacientes tendrán que vivir durante 60 o 70 años con los efectos secundarios producidos por el acondicionamiento⁽³⁹⁾ (infertilidad, retraso de crecimiento, alteraciones hormonales y otras complicaciones).

5. MANIPULACIÓN. ELIMINACIÓN DE LINFOCITOS T DEL INÓCULO

5.1. JUSTIFICACIÓN DE LA MANIPULACIÓN

La Enfermedad de Injerto Contra Huésped es una complicación inherente al trasplante alogénico de progenitores que tiene una elevada morbilidad. A pesar de los avances de las tres últimas décadas en la profilaxis y tratamiento de la EICH, esta complicación sigue produciendo una elevada morbilidad. Se conoce que los linfocitos T tienen un papel crucial en la patogenia de la EICH.

Por este motivo se desarrollaron estrategias para disminuir la carga de linfocitos T del donante, llamadas técnicas de Eliminación de Linfocitos T (ELT). Se pueden realizar por distintos mecanismos: manipulación *ex-vivo*, que consiste en disminuir la carga de linfocitos T que se introduce al paciente en el momento de la infusión de los progenitores hematopoyéticos y mecanismos *in-vivo*, administrando al paciente anticuerpos antes de la infusión de los progenitores que van a bloquear esos linfocitos T.

Los primeros trabajos preclínicos de eliminación de linfocitos T mediante gradiente de albúmina realizados en ratones corrieron a cargo de Dicke⁽⁴⁰⁾ en 1968, y consiguieron una disminución importante en la incidencia de EICH. Como los modelos murinos permitieron disminuir e incluso retirar la inmunosupresión tras la eliminación de linfocitos T, se asumió que la aplicación de esta estrategia en humanos conllevaría una disminución de mucositis, problemas renales, infecciones y otras complicaciones asociadas a la utilización de ciclosporina y metotrexato como profilaxis de la EICH. En la década de los 80 se realizaron numerosos trasplantes hematopoyéticos utilizando esta estrategia de manipulación, esperando un aumento en la supervivencia a largo plazo. Se confirmó que la incidencia de EICH, tanto aguda como crónica, disminuía de forma sustancial, pero se observaron otras limitaciones a su uso, como el aumento de recaídas y el aumento de incidencia de fallo o pérdida del injerto.

5.2. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA ELIMINACIÓN DE LINFOCITOS T

Ho y Soiffer⁽⁴¹⁾ realizaron una revisión en 2001 sobre la ELT en la que se remarcaba el hecho de que si bien la manipulación conseguía disminuir la mortalidad relacionada con el trasplante al disminuir la incidencia de EICH, en muchos casos asociaba un aumento en el fallo de injerto y, por otro lado, también asociaba una disminución en el EICL, lo que se traduciría en un aumento de recaídas postrasplante.

Ventajas de la eliminación de linfocitos T:

- Disminución de la incidencia de la EICH aguda y crónica.
- Disminución de la inmunosupresión postrasplante como profilaxis de EICH.
- Disminución de la toxicidad pulmonar y hepática en el periodo postrasplante inmediato.
- Disminución de la mortalidad relacionada con el trasplante precoz.
- Posible disminución de tiempo necesario para el injerto.
- Posible disminución del coste del trasplante.

Inconvenientes de la eliminación de linfocitos T:

- Aumento de la incidencia de fallo de injerto.
- Pérdida de EICL, con aumento en la incidencia de recaídas, sobre todo en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC).
- Aumento del riesgo de Síndrome Linfoproliferativo Postrasplante (SLP) causado por el virus de Epstein-Barr (VEB).
- Aumento de incidencia de reactivaciones de CMV.
- No diferencias en cuanto a supervivencia global con respecto a los que no reciben eliminación de linfocitos T.

Actualmente, gracias al perfeccionamiento de las técnicas de manipulación del inóculo, al mejor conocimiento de la fisiopatología de la EICH, y al papel que tienen las distintas subpoblaciones leucocitarias en su patogenia, y gracias también al desarrollo de estrategias postrasplante como las ILD, se han conseguido disminuir esas limitaciones iniciales de estos procedimientos de manipulación del inóculo en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

5.3. ESTRATEGIAS DE ELIMINACIÓN DE LINFOCITOS T DEL INÓCULO. MANIPULACIÓN EX-VIVO

5.3.1. MANIPULACIÓN CON SELECCIÓN NEGATIVA

En un primer momento se utilizaron estrategias para eliminar los linfocitos T del producto a infundir (selección negativa) . Esta técnicas requieren de gran experiencia técnica, son difíciles de estandarizar y son muy laboriosas. Se basaban tanto en técnicas inmunológicas como no inmunológicas.

Tabla 1. Métodos de selección negativa

Métodos	Mecanismo	Técnica
Métodos no inmunológicos	Separación física	- Centrifugación a contraflujo o elutriación - Aglutinación con lectinas
	Físico-químicos	Fotoactivación mediante rodamina o TH9402
Métodos inmunológicos (Anticuerpos Monoclonales, AcMo)	Toxinas	Toxinas unidas a AcMo (inmunotoxinas)
	Complemento	Lisis mediada por complemento
	Técnicas Magnéticas	Partículas o esferas inmunomagnéticas y AcMo
Eliminación de linfocitos T alorreactivos		Varias técnicas o combinación de ellas

5.3.2. MANIPULACIÓN CON SELECCIÓN POSITIVA

Después surgieron otras técnicas que permiten seleccionar los progenitores hematopoyéticos del inóculo. Estas técnicas de selección positiva, son más sencillas, rápidas y permiten seleccionar las células progenitoras a infundir, eliminando de forma indirecta las células no deseadas (linfocitos T entre otras).

Estas técnicas de selección positiva se basan en el hecho de que los progenitores hematopoyéticos inmaduros (mieloides y linfoides) expresan en su superficie la molécula CD34 y mediante la utilización de anticuerpos monoclonales frente a ese antígeno de superficie se pueden reconocer y separar los progenitores hematopoyéticos de la aféresis utilizada.

Tabla 2. Métodos de selección positiva

Métodos	Mecanismo	Técnica
Inmunoadsorción	Partículas de poliacrilamida cubiertas de avidina → CellPro, Cephate®	AcMo CD34 biotinilado en contacto con partículas de poliacrilamida con avidina
Separación Magnética	Esferas magnéticas (indirecto) → Baxter, Isolex 300i®	AcMo CD34 y esferas magnéticas
	Partículas magnéticas (directo) → Miltenyi, CliniMACS®	- AcMo CD34 unidos de forma directa a las partículas - AcMo CD133 unido de forma directa a las partículas
FACS de alta velocidad	Citómetro de flujo → System®	Marcado y separación de la población de progenitores hematopoyético de interés (CD34, CD90)

El primer método de selección CD 34⁺ que se utilizó para el uso clínico fue el Cephate Stem Cell Concentrator system (CellPro Inc; Bothell; WA, USA). Este sistema permite seleccionar las células CD 34⁺ por inmunoadsorción. La sangre periférica se incubaba con un anticuerpo CD34 biotinilado y se hacía pasar por unas columnas con partículas de poliacrilamida cubiertas de avidina, de manera que las células CD34⁺ se quedaban unidas a las paredes del sistema.

Posteriormente se desarrollaron otros sistemas fundamentados en técnicas inmunomagnéticas (Isolex 300i® y CliniMACS®)⁽⁴²⁾, basados en la separación celular mediante la utilización de campos magnéticos. Las células se incuban con un anticuerpo antiCD34 que va a unirse a las células progenitoras, que se separan a continuación del resto de células mediante la utilización de columnas o campos magnéticos. El Isolex Magnetic Cell Separation System (Baxter, Munich, Germany) utiliza un sistema inmunomagnético de partícula grande, con anticuerpos antiCD34 y esferas magnéticas. Estas esferas se separan en un segundo tiempo de los anticuerpos antiCD34. El CliniMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), con un sistema inmunomagnético de partícula pequeña. En este sistema la partícula magnética está unida de forma directa al anticuerpo antiCD34 y no hay que separarlos.

Estas estrategias de selección de CD34⁺ se utilizan más en trasplantes que utilizan sangre periférica como fuente de progenitores hematopoyéticas. Durante la aféresis se procesan dos veces la volemia para obtener así una cantidad de células CD34⁺ muy superior a la que se obtiene mediante un *harvest* de médula ósea. Así, aunque con la manipulación se pierde un porcentaje de celularidad CD34⁺, la cantidad de progenitores que se infunde al paciente es equiparable a la infundida en un trasplante con médula ósea.

5.4. ESTRATEGIAS DE MANIPULACIÓN MÁS UTILIZADAS ACTUALMENTE

Los métodos de uso clínico más empleados en la actualidad para la eliminación de linfocitos T son las técnicas de selección positiva CD34 con CliniMACS® o Isolex 300i®, y las de selección negativa CD3/CD19 con CliniMACS®. En la tabla 3 se detallan las características de estos tres métodos de selección, en cuanto al número de logaritmos de la eliminación de linfocitos T conseguida, al porcentaje de recuperación de células CD34⁺ y a la cantidad de linfocitos T que se infunden al paciente.

En el trasplante alogénico con donante familiar idéntico, la selección CD34⁺ mediante CliniMACS® sigue siendo la estrategia de manipulación más utilizada. Este tipo de manipulación permite ajustar la cantidad de linfocitos T que se quieren añadir al inóculo y permite manipular de forma adicional la fracción negativa para criopresevar linfocitos T para la posteriores infusiones (ILD). Debido a que los primeros trasplantes con selección CD34⁺ presentaron una tasa elevada de fallo de injerto, se estudió la posibilidad de añadir a los progenitores purificados tras la selección, una cantidad de linfocitos T, para asegurar el injerto⁽⁴³⁾.

Miltenyi, gracias a la tecnología CliniMACS®, ha sido capaz de desarrollar sistemas de selección negativa (eliminación) con anticuerpos anti CD3 y anti CD19 para la eliminación de linfocitos T y B (LB) del inóculo^(44,45). Con este tipo de selección negativa se conservan el 60% de las células nucleadas distintas a los linfocitos T y B, incluyendo células dendríticas, células natural Killer (NK) y otras células accesorias, así como progenitores hematopoyéticos CD34 negativos, que tendrían un papel en la recuperación inmune (evitando infecciones), facilitando un injerto estable y potenciando el efecto antitumoral del trasplante. Este tipo de estrategia se utiliza cuando se utilizan donantes no familiares idénticos (donantes no emparentados y sobre todo en trasplante de donante haploidéntico). Estrategias más novedosas son la selección negativa o eliminación de linfocitos alfa/beta (α/β)⁽⁴⁶⁾; pues se sabe que estos subtipos linfocitarios presentan alorreactividad responsable de la EICH.

Tabla 3. Comparación de las técnicas de eliminación linfocitos T más utilizadas en la actualidad

Método	ELT log	Recuperación células CD34 ⁺	Pureza (% CD34 ⁺)	Nº Linfocitos T (x10 ⁵ /Kg)
Selección CD34⁺ (Isolex 300i)	4	60	90	0,3
Selección CD34⁺ (CliniMACS)	5	70	95	< 0,1
Selección CD3/CD19⁻ (CliniMACS)	3	80	No aplica	3

El número de linfocitos T está calculado si se infundiera en un paciente de unos 70 Kg.

ELT log: logaritmos de eliminación de linfocitos T

5.5. SELECCIÓN CD34⁺ EN PACIENTES PEDIÁTRICOS

El grupo liderado por el doctor Hadgretinger realizó números estudios del proceso de eliminación de linfocitos T mediante selección de progenitores en pacientes pediátricos con buenos resultados utilizando distintas técnicas de selección positiva⁽⁴⁷⁾. Estudió los procedimientos comparando la pureza de la selección de células progenitoras mediante el sistema de separación inmunomagnética⁽⁴⁸⁾, y constatando la disminución de la incidencia de EICH, incluso utilizando donantes familiares no idénticos o no relacionados, sin necesidad de tratamiento inmunosupresor como profilaxis de EICH^(49,50). Esto hace que sea una buena estrategia para utilizar en pacientes pediátricos con enfermedades malignas⁽²³⁾.

6. QUIMERISMO

El término quimera viene de la mitología griega y hace referencia a un monstruo con cabeza de león, cuerpo de cabra y cola de dragón o de serpiente. Haciendo referencia a esta fusión de distintos seres vivos en uno mismo, se ha utilizado en medicina el término quimerismo para denominar la coexistencia en un mismo organismo de poblaciones celulares originarias de dos individuos genéticamente distintos.

Con el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos se obtiene una situación de quimerismo, ya que el paciente trasplantado posee células de estirpe hematopoyética del donante. Para obtener quimerismo se necesita inducir en el receptor una situación de inmunodepresión que permita la supervivencia de las células del donante.

El quimerismo se expresa en porcentaje de celularidad del donante; así un quimerismo del 100% implica que el 100% son células del donante, no existiendo nada de hematopoyesis del receptor. Un quimerismo del 85% implica que un 85% de la hematopoyesis corresponde al donante y un 15% a la hematopoyesis residual del receptor.

Es muy importante el estudio del quimerismo en el trasplante de progenitores hematopoyéticos, ya que va a resultar útil para comprobar el estado del injerto (es decir, detectar un rechazo y o un fallo de injerto) y también poder detectar de forma precoz la aparición de una recaída de la enfermedad de base del paciente.

6.1. TIPOS DE QUIMERISMO POSTRASPLANTE

Según la existencia o ausencia de células hematopoyéticas del paciente tras el trasplante se distingue dos situaciones⁽⁵¹⁾:

- Quimerismo completo: es aquella situación en la que todas las células hematopoyéticas proceden del donante. La mayoría de los autores consideran quimerismo completo cuando el 99% de la celularidad hematopoyética corresponde al donante, sin embargo algunos menos estrictos denominan quimerismo completo a la presencia de hasta un 5% de celularidad del receptor.
- Quimerismo mixto: se produce cuando hay coexistencia de células hematopoyéticas del donante y del receptor.

Se ha demostrado que existe una evolución del quimerismo en el periodo postrasplante, por lo que puede considerarse que el quimerismo es un proceso dinámico, esto quiere decir que pacientes con quimerismo completo en un momento determinado podrían desarrollar después un estado de quimerismo mixto y viceversa. En pacientes con quimerismo mixto el grado de celularidad autóloga puede aumentar o disminuir. En esos pacientes decimos que aumenta o disminuye su quimerismo mixto.

El quimerismo completo era la situación que idealmente se buscaba en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en pacientes que se trasplantaban con enfermedades malignas, ya que eliminando toda la hematopoyesis del receptor disminuía el riesgo de recaída de la enfermedad, como se ha demostrado en numerosos artículos de adultos y también en pacientes pediátricos⁽⁵²⁾. Por otro lado, se sabe que el quimerismo completo en el postrasplante inmediato está relacionado con un aumento de EICH aguda y crónica, con una mayor morbilidad^(53,54), además de favorecer también la aparición de infecciones y/o cuadros de autoinmunidad.

Aunque el quimerismo completo suele ser el objetivo en los trasplantes no mieloablativos, si se produce un quimerismo mixto estable se puede seguir manteniendo el efecto injerto frente a leucemia, sin ser necesario una quimera del 100%.

El quimerismo mixto se produce, por un lado, por la utilización de nuevas fuentes de progenitores, como la sangre de cordón umbilical y, por otro lado, por la utilización de acondicionamientos de intensidad reducida.

El riesgo teórico de presentar un quimerismo mixto es que un aumento progresivo de la celularidad del donante puede conllevar finalmente a un rechazo y puede permitir reaparición del clon leucémico originario del receptor.

No hay que olvidar que la recaída de una leucemia puede ocurrir con una quimera donante del 100% en médula ósea o en sangre, ya que la recaída también puede ocurrir, en ocasiones, en localizaciones extramedulares⁽⁵⁵⁾.

El quimerismo mixto sirve de plataforma para realizar inmunoterapia adoptiva mediante la infusión de linfocitos del donante, como se verá en el apartado de efecto injerto contra leucemia.

6.2. ESTUDIO DEL QUIMERISMO

Las técnicas de estudio del quimerismo han ido evolucionando a medida que lo han hecho la tecnología, sobre todo los estudios de biología molecular.

Bader y colaboradores⁽⁵⁶⁾ hacen una revisión sobre los distintos métodos de estudio del quimerismo:

- Estudio del fenotipo eritrocitario: su uso es muy limitado ya que sólo analiza la serie roja. Se podía estudiar en caso de incompatibilidad ABO o Rh entre donante y receptor. No es útil si el paciente se ha transfundido los tres meses anteriores.
- Estudios de citogenética: solo útiles si hay disparidad de género entre donante y receptor. Son técnicas muy laboriosas, poco utilizadas en la práctica habitual.
- Estudios de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, del inglés *Fluorescent in situ hybridisation*): sobre el cromosoma X o el Y. Es una técnica muy sensible (0,1-0,001%) con muy pocos falsos positivos. Pero solo sirve si hay disparidad de género entre el donante y el receptor.
- Estudio de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción también llamado RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*): se refiere a estudio de secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas de restricción) y que varían entre individuos. Es una técnica que requiere mucho tiempo para su realización.
- Estudio de microsatélites: son secuencias cortas de ADN en las que un fragmento pequeño (de 2 a 6 pares de bases) se repite de manera consecutiva. Los microsatélites se denominan STR (del inglés *Short Tandem Repeat*). Las variaciones en el número de repeticiones (no en la secuencia repetida) crean distintos alelos. Los STR se localizan normalmente en zonas no codificantes del ADN y son muy polimórficos. El estudio de los STR se basa, por tanto, en las diferencias de longitud de ADN con secuencias repetidas que existen entre el donante y el receptor. La técnica consiste en amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa, PCR (del inglés *Polymerase Chain*

Reaction) esas secuencias mediante cebadores (en inglés *primers*) marcados con fluorescencia. Cuando ha terminado la PCR, se utiliza una electroforesis capilar para separar los fragmentos (que separara esos fragmentos por tamaños).⁽⁵⁷⁾ El estudio de los microsatélites constituye la técnica de elección para el estudio del quimerismo en el trasplante de progenitores hematopoyéticos, ya que es una técnica sencilla, rápida y con alta precisión cuantitativa.

- Técnicas de realización de PCR en tiempo real: son técnicas con mucha sensibilidad y muy rápidas en su aplicación. El estudio del gen SRY del cromosoma Y tiene una alta sensibilidad pero es sólo útil si el donante es mujer y el receptor varón. El estudio de polimorfismos de nucleótidos simples SNPs (del inglés *single nucleotide Polymorphisms*) también se está desarrollando, es muy sensible pero tiene falsos positivos. De momento no se aplican de forma rutinaria en la práctica clínica habitual.

Es fundamental realizar un estudio previo al trasplante tanto al donante como al receptor, de este modo se puede decidir la técnica más adecuada para estudiar el mismo.

Cuando se ha producido la recuperación leucocitaria se realiza una determinación del quimerismo en sangre periférica o en médula ósea. Cuando el recuento leucocitario es suficiente aporta mucha más información clínica estudiar el quimerismo en subpoblaciones leucocitarias, separando linfocitos T (CD3⁺) del resto (CD3⁻).

Algunos autores recomiendan determinaciones seriadas semanales de quimerismo hasta el día más 200 postrasplante (cuando se utiliza el quimerismo para seguimiento de enfermedad en pacientes trasplantados con leucemias). Después los intervalos se espacian a cada mes durante los primeros 18 meses tras el trasplante. Destacar que a pesar del estudio de quimerismo es necesario realizar los estudios de Enfermedad Mínima Residual (EMR) en médula ósea y en sangre periférica para seguir la enfermedad de base del paciente.

7. ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED

Es la reacción resultante del reconocimiento por los linfocitos T del donante de antígenos del receptor como extraños. Las primeras descripciones de esta enfermedad, que inicialmente se conoció como enfermedad secundaria o en inglés *runt disease* fueron realizadas por el Dr. Billingham en modelos murinos^(58,59). Los animales que habían recibido un trasplante alogénico, después de haber sido sometidos a radiación, eran capaces de recuperar su hematopoyesis; pero fallecían por una enfermedad secundaria que afectaba fundamentalmente a la piel y el tracto digestivo.

Posteriormente, en los años 60 Billingham estableció las condiciones o los postulados para que se produzca la Enfermedad de Injerto Contra Huésped⁽⁵⁾:

1. El inóculo debe contener células inmunocompetentes.
2. El receptor debe tener aloantígenos que difieran de los del donante.
3. El receptor debe ser incapaz de producir respuesta inmune contra el injerto.

Tradicionalmente se clasificó la EICH en aguda o crónica según el momento de inicio de los síntomas. Se estableció como punto de corte los 100 días tras el trasplante.

7.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED

7.1.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA EICH AGUDA

Desde mediados de los años 80 Ferrara y su equipo propusieron un modelo de fisiopatogenia en el desarrollo de la EICH aguda⁽⁶⁰⁾. Es un modelo que se desarrolla en tres pasos^(61,62):

Fase 1: Efecto del acondicionamiento

El mecanismo que desencadena la EICH aguda se inicia antes de que el donante y el receptor coexistan en el cuerpo del receptor. La quimioterapia y la radioterapia utilizadas en el acondicionamiento producen en el receptor un daño tisular, a veces profundo, que produce activación de distintos tejidos (sobre todo mucosa intestinal, piel e hígado). El acondicionamiento produce una liberación masiva de citoquinas, “tormenta de citoquinas” de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) e Interleuquinas (IL) como la IL-1 y la IL-6, que provocan un estímulo de su sistema inmune. La presencia de citoquinas proinflamatorias aumenta la expresión de moléculas de adhesión, de moléculas coestimuladoras, y aumento de expresión de antígenos del sistema HLA en las células presentadoras de antígenos (APC del inglés *Antigen-Presenting Cells*). La irradiación es particularmente importante en este proceso porque activa la secreción de citoquinas como IL-1 y el TNF- α , que inducen apoptosis celular y daño epitelial particularmente en el tracto digestivo⁽⁶³⁾; esto permite que se produzcan fenómenos de translocación bacteriana y paso de toxinas como el lipopolisacárido (LPS) bacteriano desde la luz intestinal a la sangre, que van a producir la estimulación tanto de macrófagos como de linfocitos en el intestino.

La presencia de citoquinas proinflamatorias incrementa la activación de las APC del receptor y esta activación es crítica para la estimulación de los linfocitos T del donante.

La existencia del daño ocasionado por el acondicionamiento se confirma porque se ha comprobado que existe asociación entre acondicionamientos muy intensivos con aumento de citoquinas proinflamatorias y con aumento de severidad de la EICH aguda⁽⁶⁴⁾.

Fase 2: Activación de los linfocitos T del donante

Es fundamental para la activación de los linfocitos T del donante que haya una presentación de antígenos por parte de las APC y, además, que se produzca una estimulación adicional por otras moléculas. Las moléculas de adhesión median la unión inicial del Linfocito T con la APC. Cuando el receptor del linfocito T (TCR del inglés *T Cell Receptor*) reconoce un antígeno extraño, induce cambios conformacionales en las moléculas de adhesión que producen uniones de alta afinidad entre el linfocito T y la APC. Para que la activación del linfocito T sea completa es necesario que se produzcan señales coestimuladoras entre el linfocito T y la APC. Una vez que se ha producido la activación del linfocito T, se va a producir la proliferación de estos linfocitos T y además van a liberar citoquinas como K2 e Interferón gamma (INF- γ). Estas citoquinas van a producir daño tisular tanto directamente como indirectamente ya que estimularán la activación de Linfocitos T Citotóxicos (LTC) y las células NK.

También se ha observado en los pacientes con EICH una disminución de los Linfocitos T reguladores (Treg) que, en condiciones normales, son capaces de suprimir la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, mediante la producción de citoquinas inhibitorias, IL-10 y factor de crecimiento transformante o factor de crecimiento tumoral (TGF- β , del inglés *Tumor Growth Factor* o *Transforming Growth Factor*) y por inhibición de las funciones de la APC y de las células B presentadoras de antígeno⁽⁶⁵⁾.

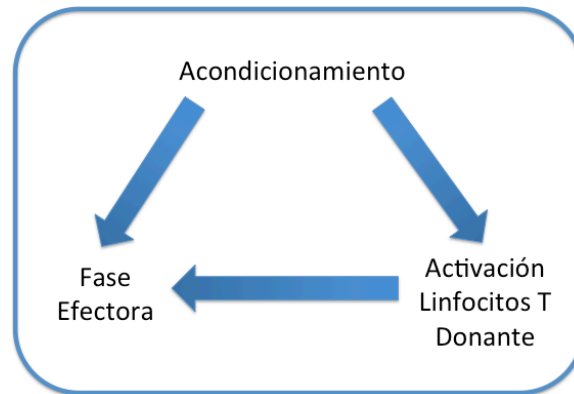
Fase 3: Fase efectora

La fisiopatología de la EICH culmina con la generación de múltiples efectores citotóxicos que contribuirán al daño tisular en los tejidos diana. Los mediadores inflamatorios solubles actúan de forma conjunta provocando daño tisular junto con los LTC y las NK que provocan directamente citolisis, causando los efectos que se observan en la EICH aguda.

Los LTC secretan perforina que se introduce en las membranas de las células diana y que forma poros que permiten la entrada a la granzima, que en el interior celular va conseguir la muerte de dicha célula. La unión de Fas a su ligando (FasL) produce señales de muerte celular por la activación de distintas caspasas. Los linfocitos T CD4⁺ citotóxicos prefieren utilizar el sistema Fas/FasL y los CD8⁺ el sistema perforina/granzima⁽⁶⁶⁾. En la fisiopatología del EICH aguda hepática el sistema de Fas/FasL es el más destacado⁽⁶⁷⁾.

En cuanto a los efectores solubles destacar: el TNF- α , la IL-1 y el óxido nítrico (NO). El TNF- α produce caquexia, activación de células dendríticas, recluta células T efectoras en los órganos diana para causar daño directo y está implicado en la fisiopatología del EICH intestinal y también se observa en el EICH cutáneo⁽⁶⁸⁾. La IL-1 sobre todo se acumula en el bazo y en la piel y es la responsable de las manifestaciones en esos órganos diana⁽⁶⁹⁾. Se produce un aumento de NO durante la fase de activación y contribuye al daño de los tejidos porque inhibe mecanismos de reparación, como el crecimiento de células epiteliales de la piel y del intestino⁽⁷⁰⁾. Por último el LPS bacteriano, que tenía un papel en el primer paso del EICH porque liberaba citoquinas, tiene su papel en el daño tisular sobre todo a nivel intestinal⁽⁷¹⁾.

Figura 2. Fisiopatología de EICH aguda



7.1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA EICH CRÓNICA

La fisiopatología de la EICH crónica no está tan clara como la de la EICH aguda, ya que no hay modelos animales que reproduzcan los aspectos clínicos de la EICH crónica.

Se considera a menudo la EICH crónica como una enfermedad autoinmune, porque presenta muchas similitudes con estas patologías, en particular con las conectivopatías.

Los linfocitos T de animales con EICH crónica producen citoquinas como IL-4 o INF- γ , sin IL-2⁽⁷²⁾. Estas citoquinas en los fibroblastos inducen producción del colágeno. También se encuentra eosinofilia como manifestación de la EICH crónica, que apoya la teoría que los linfocitos T colaboradores, (del inglés *helper*) de tipo 2 (Th2) son los mediadores en esta patología⁽⁷³⁾.

El ataque autoinmune puede deberse a un fallo en los mecanismos de regulación producidos por el daño tímico, por la inmunosupresión o por ambos. Se evidencian también alteraciones en los Treg⁽⁷⁴⁾, que están implicados en la prevención de formación de autoanticuerpos. Otra explicación para los fenómenos de autoinmunidad es que la apoptosis masiva que se produce en la fase de EICH aguda satura a las APC (macrófagos y células dendríticas) con el resultado de presentación de autoantígenos⁽⁷⁵⁾. Normalmente el timo elimina los linfocitos T autorreactivos e induce tolerancia, pero puede que estos mecanismos no funcionen correctamente, bien por el daño que se produce en el acondicionamiento o por la presencia de EICH aguda previa o por la atrofia tímica de la edad.

Los linfocitos B también pueden contribuir a la EICH crónica con la producción de autoanticuerpos. Hay distintos hechos que apoyan su participación en la EICH crónica: manifestaciones de autoinmunidad como la anemia hemolítica o la trombopenia inmune postrasplante mejoran con el tratamiento con un fármaco que bloquea los linfocitos B, un antiCD20 (Rituximab)⁽⁷⁶⁾, o la detección de anticuerpos frente a antígenos menores de histocompatibilidad⁽⁷⁷⁾.

La pérdida de tolerancia inmune en los pacientes con EICH crónica hace con los linfocitos T del donante reconozcan como extraños antígenos tanto del receptor como del donante⁽⁷⁸⁾.

7.2. ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED AGUDA

Clásicamente se ha definido como aquella que aparece durante los primeros 100 días postrasplante. El inicio suele ser en torno al mes postrasplante.

La EICH aguda afecta fundamentalmente a tres órganos diana básicos, tal y como se ha explicado en la fisiopatología de producción de la EICH aguda, que son la piel, el hígado y el intestino. Ver tabla 4.

Existen signos y síntomas acompañantes como fiebre, pérdida de peso, deterioro del estado general. La mucosas, la conjuntiva, glándulas exocrinas y los bronquios también pueden verse afectados (no van a influir en la gradación clínica).

Tabla 4. Manifestaciones típicas de EICH aguda

Órgano	Manifestaciones clínicas
Piel	Exantema eritematoso maculopapular que suele predominar en palmas y plantas. Puede evolucionar a toda la superficie corporal (mejillas, orejas, cuello, cara interna de muslos, tronco y flancos. Puede ser pruriginoso y/o doloroso. En casos severos, pueden formarse ampollas que conduzcan a descamación. Puede afectar también a mucosas.
Hígado	Colestasis con o sin ictericia franca. Más afectación de enzimas de colestasis (bilirrubina, fosfatasa alcalina, GGT) que de citolisis.
Tracto gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Forma proximal: anorexia, náuseas, vómitos e intolerancia digestiva. • Forma distal: diarrea intensa. En casos graves la diarrea puede contener restos de sangre fresca (rectorragia) y mucosa digestiva y estar acompañada de dolor abdominal. En casos muy graves también puede producirse íleo paralítico.

Hay distintos factores que pueden contribuir al desarrollo de una EICH aguda. De entre ellos, destacar las disparidades entre donante y receptor, tanto en HLA como en el género (los pacientes varones que reciben trasplantes de donantes femeninos tienen más incidencia de EICH aguda). Otro factor está relacionado con la intensidad del acondicionamiento utilizado; atendiendo a la fisiopatología de la EICH aguda el acondicionamiento constituye el primer paso en el desarrollo de la misma. Y el desarrollo de EICH aguda está íntimamente relacionado con la cantidad de linfocitos T que se infunden al paciente, así pacientes que reciben trasplantes con estrategias para eliminación de linfocitos T presentan menos incidencia de EICH aguda. Por último, es fundamental la profilaxis farmacológica de la EICH aguda (sobre todo si no se han utilizado medidas no farmacológicas de prevención de la EICH).

La EICH aguda produce alteraciones anatomopatológicas características. En la tabla 5 se detallan las alteraciones histológicas de la afectación de la EICH aguda en los órganos diana así como la clasificación del daño tisular.

Tabla 5. Alteraciones histológicas de la EICH aguda

Órgano	Características anatomopatológicas
Piel	<p>Característica la infiltración liquenoide de la parte superior de la dermis e inferior de la epidermis con vacuolización, con degeneración y necrosis celular de las células de la capa basal de la epidermis.</p> <p>Grado 1: degeneración vacuolar de células basales de la epidermis Grado 2: Grado 1 + necrosis epidérmica + cuerpos eosinofílicos Grado 3: Grado 2 + separación dermo-epidérmica Grado 4: desprendimiento de la epidermis, descamación extensa</p>
Hígado	<p>El signo histopatológico más consistente es el daño en el conductillo biliar, que normalmente se asocia con colestasis y que es raro que se afecte en otras complicaciones del TPH. Las células del epitelio biliar tienen núcleos cargados de hipercromatina o pequeños núcleos pignóticos y citoplasma con muchas vacuolas.</p> <p>Pueden verse necrosis hepatocelular y periportal con mínimo infiltrado linfocitario en el tracto portal.</p> <p>Grado 1: degeneración +/- necrosis en <25% conductos biliares Grado 2: 25-49% conductos biliares afectados Grado 3: 50-74% conductos biliares afectados Grado 4: >75% conductos biliares afectados</p>
Tracto gastrointestinal	<p>“Estallido de criptas” con necrosis de células epiteliales en la periferia de la cripta, con fragmentos de citoplasma y núcleo.</p> <p>Grado 1: necrosis del epitelio glandular y dilatación focal Grado 2: pérdida focal o difusa de glándulas o criptas Grado 3: grado 2 con ulceración focal de la mucosa Grado 4: denudación del epitelio, ulceración difusa</p>

En la EICH aguda se estudia el grado de afectación que presenta el paciente en cada uno de los órganos diana principales: la piel, el hígado y el intestino.

Tabla 6. Clasificación de afectación de cada órgano diana en la EICH aguda

Órgano	Grado	Características
Piel	1	Eritema maculopapuloso en <25% superficie corporal
	2	Eritema maculopapuloso en 25-50% superficie corporal
	3	Eritrodermia generalizada
	4	Eritrodermia generalizada con vesículas y descamación
Hígado	1	Bilirrubina entre 2 y 3 mg/dl
	2	Bilirrubina entre 3,1 y 6 mg/dl
	3	Bilirrubina entre 6,1 y 15 mg/dl
	4	Bilirrubina > 15 mg/dl
Tracto gastrointestinal	1	Diarrea 500-100 ml/día (30 ml/Kg)
	2	Diarrea 1000-1500ml/día (60ml/Kg)
	3	Diarrea > 1500 ml/día (90 ml/Kg)
	4	Dolor abdominal intenso con o sin íleo intestinal

En pacientes pediátricos para la correcta valoración de las pérdidas intestinales se hace en función del peso del niño, según los criterios de Glucksberg para pacientes pediátricos.

Tabla 7. Criterios de Glucksberg para valoración de pérdidas intestinales por EICH aguda en pacientes pediátricos

Grados	Pérdidas intestinales (cuantificación de la diarrea)
1	10-15ml/Kg/día
2	16-20 ml/Kg/día
3	21-25 ml/Kg/día
4	> 25ml/Kg/día

Para establecer una clasificación de gravedad de la EICH aguda según las manifestaciones clínicas se pueden utilizar dos sistemas. El sistema de Glucksberg y el índice de severidad del IBMTR (*International Bone Marrow Transplant Registry*). Ambas clasificaciones predicen de forma similar la mortalidad en función del grado de EICH aguda, aunque la clasificación de Glucksberg predice mejor la supervivencia. Se suele utilizar la clasificación IBMTR en los ensayos clínicos porque es menos dependiente de errores por parte del médico evaluador. Por regla general, la que más se utiliza en la práctica clínica, es la gradación clínica de Glucksberg, que se modificó en 1974⁽⁷⁹⁾.

Tabla 8. Gradación clínica de la EICH aguda. Sistema de Glucksberg.

Grados	Piel	Hígado			Tracto gastrointestinal	Afectación del estado general
Grado I	1-2	y	0	y	0	0
Grado II	1-2-3	y	1	y/o	1	1
*	3 (aislada)			o	1 (por biopsia)	
Grado III	2-3	y	2-3	y/o	2-3	2
Grado IV	2-3-4	y	2-3-4	y/o	2-3-4	3

* Esta es una modificación de la clasificación inicial que pretende valorar la afectación aislada de intestino o piel.

Tabla 9. Índice de severidad de la EICH aguda del IBMTR

Índice	Piel (Grado/Extensión piel)		Hígado (Grado/Bilirrubina)		Tracto Gastrointestinal (Grado/Diarrea)	
A	1	< 25%	1	< 2mg/dl	0	< 500 ml/día
B	2	25-50%	2	2,1-6 mg/dl	1-2	550-1500ml/día
C	3	> 50%	3	6,1-15 mg/dl	3	> 1500 ml/día
D	4	bullas	4	> 15mg/dl	4	dolor e íleo

Este índice será el correspondiente al órgano con mayor grado de afectación.

7.3. ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED CRÓNICA

Clásicamente se denominó así a la EICH que comienza tras los primeros 100 días del trasplante. La EICH crónica es la principal complicación de los trasplantes alogénicos de progenitores hematopoyéticos. Este síndrome recuerda frecuentemente a las manifestaciones de las enfermedades autoinmunes.

Clásicamente la EICH crónica se ha clasificado en limitada o extensa en función de un estudio realizado en 1980 por el grupo de Seattle⁽⁸⁰⁾ en 20 pacientes; este estudio no es reproducible en todos los pacientes, no permite evaluar correctamente la gravedad de la EICH crónica y no es capaz de predecir la Mortalidad Relacionada con el Trasplante (MRT) a largo plazo.

Posteriormente, en el mismo grupo de Seattle revisó esta clasificación para modificar las posibles ambigüedades que tenía la clasificación original⁽⁸¹⁾.

Tabla 10. Clasificación clásica EICH crónica, basada en los criterios de Seattle.

LIMITADA	EXTENSA
Afectación cutánea localizada y/o Disfunción hepática debida a EICH	Afectación cutánea extensa o Afectación limitada de piel y/o hígado y alguno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • Afectación ocular (test Schimer < 5mm) • Afectación de glándulas salivares o mucosa oral demostrada por biopsia labial • Histología hepática con hepatitis crónica agresiva, puentes de necrosis o cirrosis • Afectación de otros órganos

La EICH crónica puede tener distintas formas de presentación:

1. De Novo: cuando la EICH crónica aparece en pacientes que no han presentado EICH aguda previamente.
2. Quiescente: EICH crónica que se desarrolla tras EICH aguda resuelta.
3. Progresiva: cuando la EICH crónica es el resultado de la evolución de una EICH aguda sin resolución.

Existen factores de riesgos conocidos para desarrollar una EICH crónica como el uso de donantes no emparentados o con diferencias en el HLA, la disparidad de género, el uso de sangre periférica (la sangre de cordón umbilical es la que se asocia a menos riesgo de EICH crónica) y también el hecho de haber presentado una EICH aguda (sobre todo si la EICH aguda es moderada-grave, de grado II a IV).

La EICH crónica es una entidad de suficiente importancia clínica, ya que produce una gran morbilidad asociada al trasplante. Por este motivo se llevó a cabo la creación de un Grupo de Consenso Internacional en EICH crónica dentro del Instituto Nacional de la Salud Norteamericano (NIH, del inglés *National Institute of Health*).

Los resultados de este consenso se recogen en el artículo que firmó Filipovich y colaboradores en 2005⁽⁸²⁾. Este documento de consenso tiene tres objetivos:

1. Proponer una nueva clasificación de la EICH que no atienda solo a la fecha de aparición de los síntomas, sino que haga referencia a las características de la enfermedad y a su modo de aparición.
2. Establecer criterios diagnósticos para la EICH crónica que se detallarán a continuación.
3. Proponer un sistema de puntuación para la gravedad de la EICH crónica (*Score*).

El diagnóstico de la EICH crónica requiere establecer el diagnóstico diferencial con la EICH aguda, que se debe basar en las características de la reacción y no exclusivamente en criterios cronológicos. Se deben excluir otros posibles diagnósticos (infecciones, segundas neoplasias, reacciones farmacológicas). Y por último para establecer el diagnóstico de EICH crónica se necesita la presencia de al menos un signo clínico diagnóstico, o al menos una manifestación característica confirmada por la correspondiente biopsia o prueba complementaria diagnóstica (prueba de laboratorio o radiológica) en el mismo órgano o en otro.

En la tabla 11, quedan reflejados los signos y síntomas de la EICH crónica divididos por órganos y tejidos. Se distinguen los signos y síntomas en función de lo específicos que sean para la EICH crónica. Se dividen en cuatro grupos:

- Signos y síntomas diagnósticos: son los signos y síntomas que establecen por sí mismos el diagnóstico de EICH crónica, sin necesidad de pruebas complementarias o evidencia de lesión en otro órgano.
- Signos y síntomas característicos: no se observan habitualmente en la EICH aguda, pero no son suficientes para establecer el diagnóstico de EICH crónica de forma inequívoca sin la ayuda de otras pruebas o demostración de lesión en otros órganos.
- Otras manifestaciones: se engloban signos y síntomas que se consideran parte de la EICH crónica si se confirma el diagnóstico de la misma.
- Signos y síntomas comunes: se pueden encontrar tanto en la EICH aguda como en la EICH crónica.

Tabla 11. Signos y síntomas de EICH crónica por órganos y tejidos según la NIH

Órgano	Diagnósticos	Característicos	Otras manifestaciones	Comunes
Piel	Poiquilodermia Liquen plano Cambios escleróticos Morfea Liquen escleroso	Despigmentación	Alteración sudoración Ictiosis Hipo/hiper-pigmentación	Eritema Exantema maculopapular Prurito
Uñas		Distrofia Uñas quebradizas, estrías Onicolisis <i>Pterigium</i> ungueal Pérdida ungueal*		
Cuero cabelludo y vello corporal		Alopecia Lesiones pápulo-escamosas	Pelo fino, desigual, opaco Canas precoces	
Boca	Liquen plano Hiperqueratosis Esclerosis (dificultad para apertura boca)	Pseudomembranas* Úlceras*		Dolor
Ojos		Sequedad, dolor, sensación de cuerpo extraño** Conjuntivitis cicatricial Queratoconjuntivitis seca** Queratopatía <i>punctata</i>	Fotofobia Hiperpigmentación periorbitaria Blefaritis	
Genitales	Liquen plano Estenosis vaginal	Erosiones, fisuras* Úlceras*		
Digestivo	Liquen plano Estenosis alta o 1/3 medio esófago		Insuficiencia pancreática exocrina	Anorexia Náusea-vómitos Diarrea ↓ de peso Retraso crecimiento (niños)

Hígado				↑Blr o FA > 2 veces normal ↑GOT o GPT > 2 veces normal
Pulmones	Bronquiolitis Obliterante (BO) diagnosticada por biopsia***	BO diagnosticada por pruebas función respiratoria y radiología***		Bronquiolitis Obliterante con neumonía organizada (BONO)
Aparato locomotor	Fascitis Rigidez o contractura articular por esclerosis	Miositis** Polimiositis**	Edema Calambres Artralgias o artritis	
Sistema hematopoyético e inmune			Trombopenia Eosinofilia Linfopenia ↑↓γglobulinemia Anemia hemolítica Púrpura inmune	
Otros			Derrame pleural, pericárdico, ascitis Neuropatía periférica Síndrome nefrótico Miastenia <i>gravis</i> Arritmias o cardiomiopatía	

* Siempre hay que descartar infección, toxicidad por fármacos o neoplasia

** Requiere biopsia o confirmación radiológica, o test de Schimer en casos de ojos

*** El diagnóstico de Bronquiolitis obliterante requiere de la confirmación histopatológica. Si el diagnóstico se establece mediante otros estudios (test de función pulmonar y radiológicos) requiere de la presencia de una manifestación diagnóstica en al menos otro órgano.

Una vez establecido el diagnóstico de EICH crónica es muy importante clasificar la gravedad de la misma para instaurar un tratamiento de forma precoz.

El Grupo de Consenso Internacional del NIH⁽⁸²⁾ propone estas hojas de trabajo para recogida de todos los datos y así establecer una valoración de la gravedad de la EICH crónica por órganos (*Clinical Organ Scoring*).

Tabla 12. *Clinical Organ Scoring* de la NIH para la EICH crónica

Puntuación	0	1	2	3
Estado general	Asintomático y totalmente activo (ECOG 0, KPS 100%)	Sintomático, ambulatorio, limitación actividad física extenuante (ECOG 1, Índice Karnofsky, IK, 80-90%)	Sintomático, ambulatorio, se vale por sí mismo, deambula >50% del tiempo (ECOG 2, IK 60-70%)	Sintomático, dificultad para su propio cuidado, >50% en sillón-cama (ECOG 3-4, IK <60%)
Piel Exantema maculopapular Liquen plano Ictiosis, lesiones pápuloescamosas Hiperpigmentación Hipopigmentación Queratosis pilaris Eritema Eritrodermia Poiquilodermia Esclerosis Prurito Afectación uña Afectación capilar % SC afecta	No síntomas	< 18% SC afecta pero <u>sin</u> esclerosis	19-50% SC afecta <u>o</u> esclerosis superficial (se puede pellizcar)	> 50% SC afecta <u>o</u> esclerosis profunda <u>o</u> movilidad limitada o prurito grave
Boca	No síntomas	Síntomas moderados que <u>no</u> dificultan ingesta	Síntomas moderados que <u>sí</u> limitan parcialmente la ingesta	Síntomas graves <u>con</u> limitación grave de la ingesta

Ojos Test lacrimal >10 mm 6-10 mm <= 5 mm No realizado	No síntomas	Sequedad ocular leve que no afecta actividad cotidiana (lágrimas ≤ 3 veces al día) <u>o</u> queratoconjuntivitis seca asintomática	Sequedad ocular moderada que afecta algo a la actividad cotidiana (lágrimas > 3 veces/día) <u>sin</u> pérdida agudeza visual	Sequedad ocular grave que afecta significativamente a la actividad cotidiana (dolor) <u>o</u> incapacidad laborar por síntomas oculares <u>o</u> pérdida de visión por queratoconjuntivitis seca
Tracto Gastrointestinal	No síntomas	Síntomas como disfagia, anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, sin pérdida de peso (<5%)	Síntomas que ocasionan pérdida de peso 5-15%	Síntomas con pérdida de > 15% peso, que requiera aportes calóricos adicionales o dilatación esofágica
Hígado	Función hepática normal	Blr, FA, GOT o GPT < 2 veces límite alto (2x)	Blr > 3 mg/dl o Blr, GOT, GPT 2-5x	Blr, GOT, GPT > 5x
Pulmón FEV ₁ _____ DLCO _____	No síntomas FEV ₁ > 80%	Disnea al subir un tramo escalera FEV ₁ 60-79%	Disnea al caminar sobre llano FEV ₁ 40-59%	Disnea de reposo, requerimiento O ₂ FEV ₁ <39%
Locomotor	No síntomas	Rigidez leve de extremidades, con normalidad o leve dificultad de movimientos	Rigidez <u>o</u> contracturas <u>o</u> fascitis, con moderada limitación funcional	Contracturas con significativa limitación de la movilidad
Genital	No síntomas	Síntomas con signos leves en la exploración <u>sin</u> repercusión en la función sexual	Síntomas con signos moderados en la exploración <u>con</u> dispareunia o discomfort al examen ginecológico	Síntomas <u>con</u> signos avanzados (estenosis, aglutinación labial, úlceras graves) <u>y</u> dolor grave durante el coito o imposibilidad de insertar espéculo

Otros indicadores, manifestaciones clínica o complicaciones relacionadas con EICH crónica. Indicar su grado de gravedad según su repercusión funcional de 0: ninguno, 1: leve, 2: moderado, 3: grave

Estenosis o membranas esofágicas _____	Derrame pericárdico _____ Síndrome nefrótico _____	Derrame pleural _____ Neuropatía periférica _____
Ascitis (serositis) _____	Miocardiopatía _____	Eosinofilia > 500/microL _____
Miastenia gravis _____	Alteración de la conducción cardíaca _____	Coronariopatía _____
Polimiositis _____	Inicio progresivo _____	
Plaquetas < 100 x 10 ⁹ /L _____		
Otros: _____		

El grupo de Consenso⁽⁸²⁾ mediante todos estos indicadores estableció un sistema para clasificar al EICH crónica según su gravedad en tres grados: leve, moderada y grave.

Tabla 13. Clasificación de gravedad de EICH crónica según NIH

Grado de afectación	Características
Leve	1 o 2 órganos (excepto pulmón) sin repercusión funcional significativa (puntuación máxima de 1 en todos los órganos afectados)
Moderada	Al menos 1 órgano afectado con repercusión clínica funcional, pero no grave (puntuación máxima 2) o > 3 órganos sin repercusión funcional significativa (puntuación máxima de 1 en todos los órganos afectados)
Grave	Indica limitación funcional grave (puntuación 3 en cualquier órgano) Una puntuación > 2 pulmonar se considera grave

7.4. RECLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED

Los avances en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos han producido un cambio en la presentación e historia natural de la EICH.

Los motivos que han propiciado estos cambios son por un lado la utilización de fuentes de progenitores hematopoyéticos distintas a la médula ósea (sobre todo la sangre periférica), el cambio de fármacos usados en el acondicionamiento de los pacientes (acondicionamientos menos mieloablativos y más inmunosupresores), la manipulación del inóculo y la infusión posterior de linfocitos del donante de forma periódica, y por supuesto, la utilización de profilaxis de forma sistemática de la enfermedad de injerto contra huésped (tanto con medidas farmacológicas como no farmacológicas).

Tabla 14. Nueva clasificación de la EICH propuesta por el NIH⁽⁸²⁾

Tipo de EICH	Tiempo de aparición tras TPH o ILD	Signos/síntomas de EICH aguda *	Signos/síntomas de EICH crónica **
AGUDA			
• Clásica	< 100 días	Sí	No
• Persistente, recurrente o de inicio tardío	> 100 días	Sí	No
CRÓNICA			
• Clásica	Sin límite de tiempo	No	Sí
• “Overlap” (solapamiento)	Sin límite de tiempo	Sí	Sí

* Se consideran como signos/síntomas de EICH aguda: exantema maculopapular, náuseas, vómitos, anorexia, diarrea intensa, íleo o hepatitis colestásica.

** Ver la tabla 11 , tabla de signos y síntomas de EICH crónica

8. EFECTO INJERTO CONTRA LEUCEMIA

El objetivo del trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes con enfermedades malignas es evitar la recaída. Históricamente se pensaba que el trasplante hematopoyético servía para reemplazar la hematopoyesis que había sido dañada de forma irreversible por la quimioterapia y la radioterapia del acondicionamiento. Basándose en estas creencias, se preferían como donantes a los propios pacientes (trasplante autólogo) o a donantes singénicos (hermanos gemelos). Actualmente, se conoce el poder que tienen las células del donante para eliminar las células leucémicas, mediante un efecto aloinmune del trasplante: el Efecto Injerto Contra Leucemia (EICL). Mathé ya en el año 1965 acuñó el concepto de inmunoterapia adoptiva, que hace referencia al hecho de que las células inmunocompetentes del donante pueden eliminar las células de la leucemia⁽⁶⁾.

En las enfermedades malignas, se observó que los trasplantes autólogos tenían una tasa de recaídas superiores comparados con trasplantes alogénicos de familiares HLA idénticos⁽⁸³⁾, por lo que de este hecho se dedujo que existía un efecto aloinmune en el trasplante capaz de controlar la enfermedad neoplásica.

Con el inicio de utilización de técnicas para eliminación de linfocitos T, como medida para prevenir la EICH, se comprobó que había un aumento en el número de recaídas. De esta experiencia se asume que el papel de los linfocitos T en el EICL es crucial^(41,84).

La sola presencia de los linfocitos T no es suficiente, aunque sí necesaria, para el desarrollo de un efecto antileucemia, porque no se evidencia este efecto antileucemia en los trasplantes alogénicos que se realizan entre gemelos idénticos (trasplantes singénicos)⁽⁸⁵⁾.

Después de un trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico se pueden producir distintas respuestas inmunes alorreactivas⁽⁸⁶⁾; algunas no son beneficiosas, como son el rechazo del trasplante o la enfermedad de injerto contra huésped, y otras beneficiosas como el efecto injerto contra leucemia que se traduce en un control de la enfermedad de base y la no recaída de los pacientes. El objetivo final del trasplante sería poder separar estos fenómenos aloinmune para potenciar el efecto antileucemia y poder minimizar o suprimir tanto la EICH como la posibilidad de rechazo.

Barnes y Loutit fueron los primeros en demostrar que existía un EICL en modelos animales y que las células inmunes derivadas del donante podían contribuir a la erradicación de la leucemia, aunque los modelos fallecían de EICH⁽⁸⁷⁾.

Weiden fue el primero que demostró este efecto de EICL en pacientes humanos con leucemia⁽⁸⁸⁾. Demostró que existía una disminución de las recaídas en aquellos pacientes que presentaban EICH aguda o crónica, y sugirió un mecanismo aloinmune que prevenía de la recaída en estos pacientes.

Horowitz a principios de la década de los 90 realizó estudios en más de dos mil pacientes que habían recibido trasplante alogénico para estudiar en ellos el efecto injerto frente a leucemia⁽⁸⁹⁾. Concluyó que existían distintas formas de efecto injerto contra leucemia. Uno de ellos es el que asocia el EICL a la EICH; este hecho lo apoya el que los pacientes con EICH tenían menores tasas de recaídas. Existe también una forma de EICL no asociada al EICH, los pacientes que recibían un trasplante de un gemelo idéntico recaían más que los que se trasplantaban de un donante HLA idéntico y que no presentaban EICH. Existe un efecto antileucemia relacionado directamente con los linfocitos T, al realizar trasplantes con eliminación de linfocitos T estos pacientes aunque presentaran EICH tenían mayor tasa de recaída, si se comparaban con pacientes que recibían trasplantes alogénicos sin manipular.

El efecto injerto frente a leucemia está mediado por dos clases distintas de linfocitos: por las Natural Killer (NK) y por los linfocitos T⁽⁹⁰⁾. Las NK son una población que se encuentra entre las células del sistema inmune innato y el específico. Las células NK del donante son capaces de producir importantes reacciones inmunes en el receptor tras el trasplante alogénico. Pueden producir EICL sin necesidad de producir EICH. Las NK son los primeros linfocitos que se recuperan en número tras un trasplante alogénico. En algunos trabajos se ha demostrado que el número de NK al mes del trasplante es un factor determinante en la recaída de pacientes con leucemias mieloides, no en linfoides⁽⁹¹⁾. Hay distintos factores que influyen en la recuperación precoz de NK, uno es el número de progenitores que contenga el inóculo y otro si se realiza manipulación; si se realiza una eliminación de linfocitos T las células NK no tienen que competir con ellos por la citoquinas (IL-15) y la recuperación de NK precoz es más potente. El efecto injerto frente a leucemia de las NK está restringido a las hemopatías mieloides.

Los linfocitos T son la otra población que media el EICL. Para que los linfocitos T puedan desarrollar su efecto antileucemia es necesario que las células de la leucemia presenten antígenos específicos que el linfocito T pueda reconocer. En los trasplantes idénticos, la respuesta inmune no ataca directamente a los polimorfismos del sistema HLA, porque son idénticos, en inglés *match*. Estos antígenos frente a los que responde el Linfocito T se han denominado antígenos menores de histocompatibilidad.

Antígenos menores de histocompatibilidad son aquellos aloantígenos que son capaces de provocar una respuesta alogénica de linfocitos T entre individuos HLA idénticos. Son péptidos derivados de proteínas intracelulares polimórficas que pueden ser presentados por moléculas HLA de clase I o II en su superficie de membrana, y que pueden ser reconocidos como antígenos extraños por parte de los linfocitos T de individuos con HLA idéntico^(86,92).

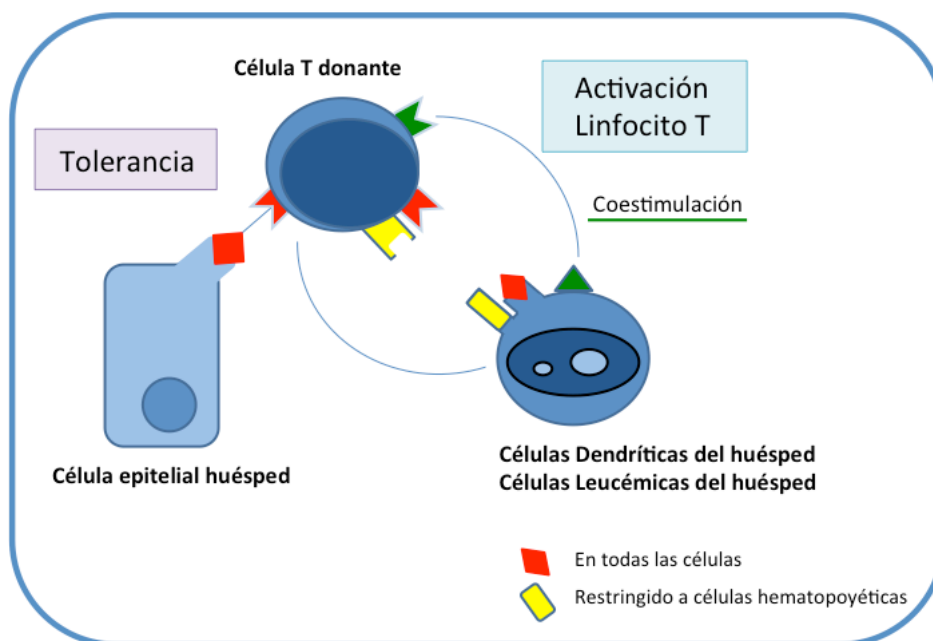
Se han identificado muchos antígenos menores de histocompatibilidad. La importancia de la respuesta de los linfocitos T frente a estos antígenos menores radica en la distribución que estos antígenos tengan en los tejidos; hay algunos que están expresados en casi todos los tejidos (epítomos masculino-específicos, HA3, HA8), otros tienen su expresión restringida a ciertos grupos celulares como por ejemplo células hematopoyéticas (HA1, HA2), linfocitos B (HB1) y algunas, como CD31, en todas las células no hematológicas. Además hay proteínas que no se expresan de forma normal pero que sí que lo hacen tras activarse por respuestas inflamatorias (se expresan antígenos menores en tejidos que normalmente no lo expresan tras una respuesta inflamatoria).

La expresión de los antígenos menores de histocompatibilidad expresados por la célula leucémica pueden servir de diana para el reconocimiento del linfocito T del donante y así llevar a cabo su efecto tumoricida. Para que esto ocurra es necesario que el linfocito T pueda reconocer ese antígeno menor en la célula leucémica. El EICL puede llevarse a cabo mediante alorreactividad frente antígenos expresados de forma ubicua en todos los tejidos como epítomos masculino específico (está demostrado que los pacientes masculinos que reciben un trasplante alogénico de una donante femenina tienen menos recaídas) o frente antígenos que tienen restricción celular, en concreto a las células hematopoyéticas. Después de un trasplante alogénico el receptor sustituye su hematopoyesis propia por la del donante. Si los linfocitos T del donante reconocen antígenos menores restringidos a las células hematopoyéticas, incluyendo clon leucémico, se procederá a su eliminación. Si se infunden linfocitos del donante, las células del receptor que expresan esos antígenos menores serán eliminadas (las sanas y las malignas). Existe una asociación entre conversión de quimerismo mixto a

quimerismo completo tras infusión de linfocitos del donante y la obtención de remisión completa de la enfermedad maligna, incluso sin producción de EICH. Esto apoya la teoría de que los linfocitos T van a actuar contra los antígenos menores de las células sanas y malignas del receptor. Por tanto, los antígenos menores de histocompatibilidad restringidos a la línea hematológica sirven de diana específica contra la leucemia en los pacientes que reciben un trasplante alogénico de progenitores y con posteriores infusiones de linfocitos del donante.

El grupo del Dr. Kolb es uno de los que más ha estudiado el EICL^(89,93-95). La fisiopatología de la reacción del injerto frente a las células del receptor se basa en el concepto de que para que el linfocito T del donante se active y sea capaz de llevar a cabo la destrucción de la célula del receptor tiene que haber una interacción celular del linfocito T del donante con la célula presentadora de antígeno (APC) del receptor. Las células presentadoras de antígeno van a expresar en su superficie los antígenos menores de histocompatibilidad que van a ser reconocidos por el linfocito T y para que este se active, es necesario que se produzcan otras señales coestimuladoras entre la APC y el Linfocito T. Los mejores antígenos menores de histocompatibilidad para que se produzca un potente EICL son aquellos que solo se expresen en células de estirpe hematopoyética ya que el efecto aloimmune será llevado a cabo solo en esta línea celular sin producir EICH⁽⁹⁶⁾. Factores como el daño que se produce con el acondicionamiento (quimioterapia y radioterapia) y la presencia de infecciones (bacterianas o virales) facilitan la estimulación acelerada de los linfocitos T. Con el tiempo las APC del receptor se sustituyen por APC del donante y ya no serán capaces de presentar esos antígenos menores al linfocito T creando un estado de inmunotolerancia.

Figura 3. Esquema de Inmunoterapia adoptiva



8.1. INFUSIÓN DE LINFOCITOS DEL DONANTE

Esta estrategia forma parte de lo que se considera inmunoterapia postrasplante. Consiste en infundir una pequeña cantidad de linfocitos T del donante al paciente un tiempo después del trasplante. Por tanto, el uso de Infusión de Linfocitos T del Donante (ILD) es una forma de inmunoterapia adoptiva. El uso de estos linfocitos T del donante se sustenta en datos que apoyan que los linfocitos T juegan un papel crucial en el EICL, como son que los pacientes que reciben un trasplante de donante singénico recaen más, que al eliminar la inmunosupresión en pacientes con recaídas postrasplante se han conseguido, en ocasiones, inducir una remisión y, que se han evidenciado más recaídas en pacientes que reciben un trasplante con eliminación de linfocitos T⁽⁹⁷⁾.

Inicialmente se ha utilizado esta estrategia como tratamiento de la recaída en los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC), la primera vez por el Dr Kolb⁽⁹³⁾. Con este tipo de tratamiento se consiguieron remisiones completas, incluso moleculares. El primer paciente en el que se utilizaron las ILD como tratamiento de recaída postrasplante ha conseguido una remisión completa duradera, incluso 20 años después⁽⁹⁵⁾.

No todas las hemopatías malignas responden igual de bien, ya que las leucemias agudas en las que cuando se produce una recaída la carga tumoral es importante (por la rápida división de los blastos) el resultado de las ILD no tiene unas tasas de remisión tan altas. De hecho muchos autores recomiendan en estas leucemias agudas iniciar un tratamiento con quimioterapia para conseguir remisión de la enfermedad y después infundir los linfocitos. En casos de Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) la posibilidad de inducir remisión con el uso de ILD está en torno a un 15-20%. Estos resultados son peores cuando se trata de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), ya que como se ha demostrado en distintos estudios si el paciente no consigue remisión con la quimioterapia el uso de ILD no aporta beneficio⁽⁹⁸⁾. Hay casos de pacientes con LLA que consiguen remisiones tras ILD, como un niño con una recaída postrasplante de una LLA que recibió ILD consiguiendo entrar en remisión y mantenerla durante 15 años⁽⁹⁹⁾.

El riesgo asociado a las ILD por un lado es el desarrollo de una EICH y, por otro lado inducir en el paciente una situación de aplasia. La incidencia de aparición de EICH después de una ILD varían de unos estudios a otros 20 y 60%⁽¹⁰⁰⁾, no siendo por lo general EICH grave. La aparición de la aplasia post-ILD suele guardar relación con el grado de hematopoyesis del receptor⁽¹⁰¹⁾. La situación de aplasia tras la infusión de linfocitos suele producirse en pacientes con LMC en recaída postrasplante que reciben tratamiento con ILD, con una incidencia entre un 20-40%.

La dosis de linfocitos T que hay que administrar en cada infusión no está muy definida, ya que no hay estudios que comparen eficacia de unas dosis frente a otras.

El uso de ILD de forma anticipada, en inglés el término es *preemptive*, vino después para intentar utilizar este tipo de inmunoterapia antes de que los pacientes presentaran recaída postrasplante. El uso de ILD de forma anticipada lleva asociada normalmente una retirada precoz de la inmunosupresión con objeto de fomentar el poder antileucémico de los linfocitos T. Uno de los primeros que utilizó las ILD como tratamiento anticipado en pacientes con LMC fue el Dr. Schapp⁽¹⁰²⁾, que observó que los pacientes que recibían esta inmunoterapia presentaban mejor supervivencia libre de eventos y menores tasas de recaídas. Después se ha estudiado el uso anticipado de ILD en pacientes con leucemias agudas, en las que se demuestra que mejora el EICL ya que los pacientes que los reciben no recaen, pero en ocasiones se produce EICH, que es grave en algunos pacientes⁽¹⁰³⁾.

No hay muchos estudios del uso de ILD en pacientes pediátricos⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁸⁾. El uso de ILD en pacientes pediátricos para tratamiento de las recaídas postrasplante tiene muchas limitaciones, ya que la mayoría de leucemias que presentan los pacientes pediátricos son leucemias agudas, que en el momento de la recaída presentan una elevada carga tumoral. Por eso en estos pacientes es importante más aún desarrollar estrategias que fomenten el EICL antes de que la recaída se produzca.

La estrategia de utilizar ILD de forma anticipada junto con supresión de la inmunosupresión en pacientes pediátricos proporciona buenos resultados, sin recaídas y consiguiendo una supervivencia libre de eventos que iguala a la de los pacientes que presentan EICH o a los que obtienen de forma espontánea quimerismo completo⁽¹⁰⁹⁾.

9. RECONSTITUCIÓN INMUNE POSTRASPLANTE

Existe una diferencia entre reconstitución inmune (que hace referencia a un concepto cuantitativo), y recuperación inmune (que hace referencia a la cualidad o calidad de esa respuesta).

Tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos, se produce una fase inicial de aplasia con neutropenia, que suele durar en torno a 14 días si la fuente de progenitores es la sangre periférica, 21 días si es médula ósea y, en torno al mes si se utiliza sangre de cordón umbilical⁽¹¹⁰⁾.

Los primeros linfocitos que se recuperan son las células NK, que lo hacen en las primeras semanas postrasplante. Los linfocitos, tanto B como T, necesitan más tiempo y aunque se recuperan en número hacen falta varios años para que la funcionalidad de los mismos sean correcta.

Hay distintos factores que influyen en la reconstitución inmune después de un trasplante alogénico:

- Factores relacionados con el receptor: edad, género, tipo de acondicionamiento que ha recibido, patología de base.
- Disparidad entre donante y receptor: grado de disparidad HLA entre donante y receptor, incluyendo presencia de antígenos menores de histocompatibilidad.
- Factores relacionados con el tipo de trasplante: como la fuente de progenitores utilizada o la estrategia de trasplante (si se ha utilizado manipulación para eliminar los linfocitos T del donante, si posteriormente se han usado infusiones de linfocitos del donante).
- Inmunosupresión: los fármacos inmunosupresores afectan tanto cuantitativa como cualitativamente a la recuperación de las distintas subpoblaciones linfocitarias.
- Relacionados con eventos postrasplante: presencia de EICH aguda y/o crónica, complicaciones infecciosas, efecto de tratamientos utilizados (anticuerpos anti-CD20 u otros anticuerpos monoclonales)
- Factores relaciones con el donante: edad, sexo, embarazos anteriores, seropositividad frente a CMV.

Las infecciones son complicaciones importantes en los pacientes que han recibido un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Estas infecciones se producen porque no se ha recuperado un sistema inmune normal y además retrasan la reconstitución inmune.

El número de progenitores hematopoyéticos que se infunden al paciente influye en la rapidez de la reconstitución inmune.

La reconstitución inmune se puede ver retrasada en los trasplantes con estrategias de eliminación de linfocitos T. La reconstitución inmune mejora cuando el paciente adquiere quimerismo completo y con el uso de inmunoterapia adoptiva (como el uso de infusión de linfocitos del donante).

9.1. LINFOCITOS T

La reconstitución inmune de linfocitos T viene de dos caminos:

- **Timo independiente:** es la que se produce por la expansión periférica de los linfocitos T memoria ($CD45RO^+$). Estos linfocitos T memoria pueden venir del donante o pertenecer al remanente de linfocitos T memoria que queden en el receptor después del acondicionamiento. Si la estrategia utilizada en el trasplante implica una eliminación de linfocitos T del inóculo esta recuperación inmune timo independiente solo puede producirse por la expansión de linfocitos T memoria del huésped. Los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ memoria se expanden por un aumento en la producción de citoquinas (IL-7 e IL-15), estos linfocitos T memoria normalmente presentan actividad frente a virus herpes (CMV, VEB).
- **Timo dependiente:** consiste en la generación de linfocitos T a partir de los progenitores hematopoyéticos, que lleguen al timo y terminen allí su maduración y después que salgan de él a la circulación. Cuando estos linfocitos salen del timo se les denomina RTE (del inglés, *Recent Thymic Emigrants*) y son linfocitos con un amplio repertorio para reconocer antígenos y reactividad (en inglés, *naive*) $CD45RA^+$. Estos linfocitos van a proporcionar mejores respuestas frente a las infecciones, pero son también responsables de la enfermedad de injerto contra huésped.

Figura 4. Expansión de los linfocitos T

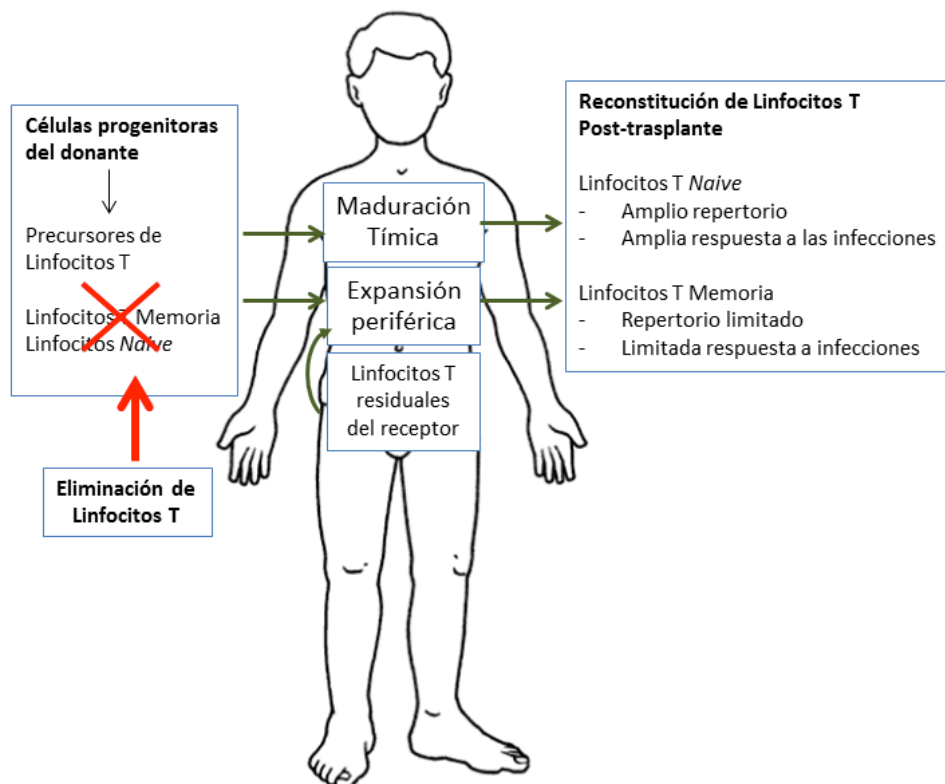
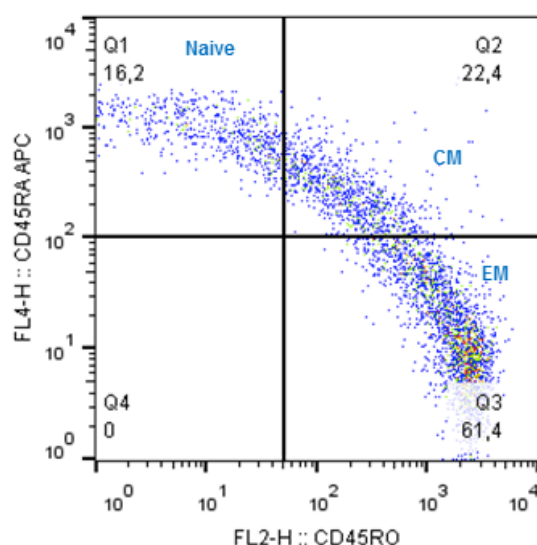


Tabla 15. Características fenotípicas y clínicas de la maduración de los linfocitos T

	Médula ósea	Órganos linfoides	Tejidos periféricos
	<i>Naive</i>	Memoria Memoria central (CM)	Memoria Memoria efectora (EM)
RA+	+++	+/-	-
RO+	---	+	+
CCR7 (ganglio)	-	+	-
CCR4 (piel)	-	-	+
CCR6 (pulmón)	+/-	+	+
CCR9 (intestino)	-	-	+
CD62L	+	+	-
Espectro ante infecciones	Amplio	Reducido	Reducido a antígeno concreto
Riesgo de EICH	+++	++	+

Figura 5. Citometría de flujo de la maduración de los linfocitos T



CM: Memoria central. EM: Efectora memoria

El funcionamiento del timo es fundamental para la reconstitución inmune postrasplante⁽¹¹¹⁾. La presencia de EICH aguda retrasa la recuperación de linfocitos T dependiente del timo. El daño que se produce en el timo por la EICH aguda es reversible en pacientes jóvenes (< de 25 años). Sin embargo, el efecto de la EICH crónica en la funcionalidad del timo es independiente de la edad del receptor. Este proceso de recuperación inmune timo dependiente es muy largo, y en el que dependen la edad del receptor y los procesos postrasplante como la EICH.

La importancia del timo es una característica fundamental en el trasplante hematopoyético pediátrico que no tienen los adultos. Entre otras cosas, justifica que no se utilice irradiación corporal total como parte del acondicionamiento previo al trasplante y aboga por acondicionamientos menos lesivos como los de intensidad reducida.

La reconstitución inmune de linfocitos T *naïve* es la clave para mantener una buena recuperación inmune, aunque estos sean los responsables de la EICH. La inmunoterapia adoptiva (mediante la infusión de linfocitos del donante) en el periodo postrasplante puede ayudar a compensar la falta de linfocitos T antígeno-específicos inmunocompetentes.

9.2. CÉLULAS NATURAL KILLER

Las células NK son la subpoblación linfocitaria que se recupera antes. Hay dos tipos de NK según la expresión de la media de intensidad de fluorescencia del antígeno CD56: de alta intensidad (*bright*, del inglés brillante) y de baja intensidad (*dim*, del inglés oscuras). Las NK *bright* tienen una función más secretora y menos citotóxica y las NK *dim* una función más citotóxica y menos secretora. La recuperación NK postrasplante es sobre todo a expensas de NK *bright*.

Los receptores de las NK expresan distintos tipos de receptores, unos activatorios y otros inhibitorios. Los receptores KIR (del inglés *Killer Immunoglobulin-like receptors*) se heredan independientemente del HLA; así entre hermanos HLA idénticos existe aproximadamente un 75% de disparidad KIR y entre donantes no emparentados HLA idénticos un 100%.

En pacientes con patología mieloide se ha atribuido EICL a las células NK y particularmente importante en el trasplante de progenitores de donante haploidéntico (entre familiares que solo comparten un haplotipo)⁽¹¹²⁾.

9.3. LINFOCITOS B

Los linfocitos B no se normalizan hasta por lo menos un año postrasplante. Niveles bajos de linfocitos B se han asociado a mayores tasas de infecciones⁽¹¹³⁾.

Los linfocitos B están implicados en la fisiopatología de la EICH crónica ya que se produce una expansión clonal de linfocitos B y una generación de autoanticuerpos. Se conoce también que el tratamiento con Rituximab (anticuerpo anti CD20, que es un antígeno de superficie de linfocitos B) mejora algunas manifestaciones de EICH crónica^(114,115).

Tras el trasplante alogénico se recuperan niveles de anticuerpos frente a patógenos más comunes (familia de herpes), pero no frente a otros, por lo que es muy importante la revacunación postrasplante, normalmente a partir de los seis meses (dependiendo de la situación de cada paciente, de si toma inmunosupresión y si presenta EICH activa).

La persistencia de déficits en distintas inmunoglobulinas (Ig) contribuye al desarrollo de distintas infecciones en el postrasplante; el déficit de Ig A favorece las infecciones de mucosas y del tracto respiratorio y el déficit de IgG2 e IgG4 aumento de infecciones por gérmenes encapsulados (*Streptococcus pneumoniae* o *Haemophilus influenzae*).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

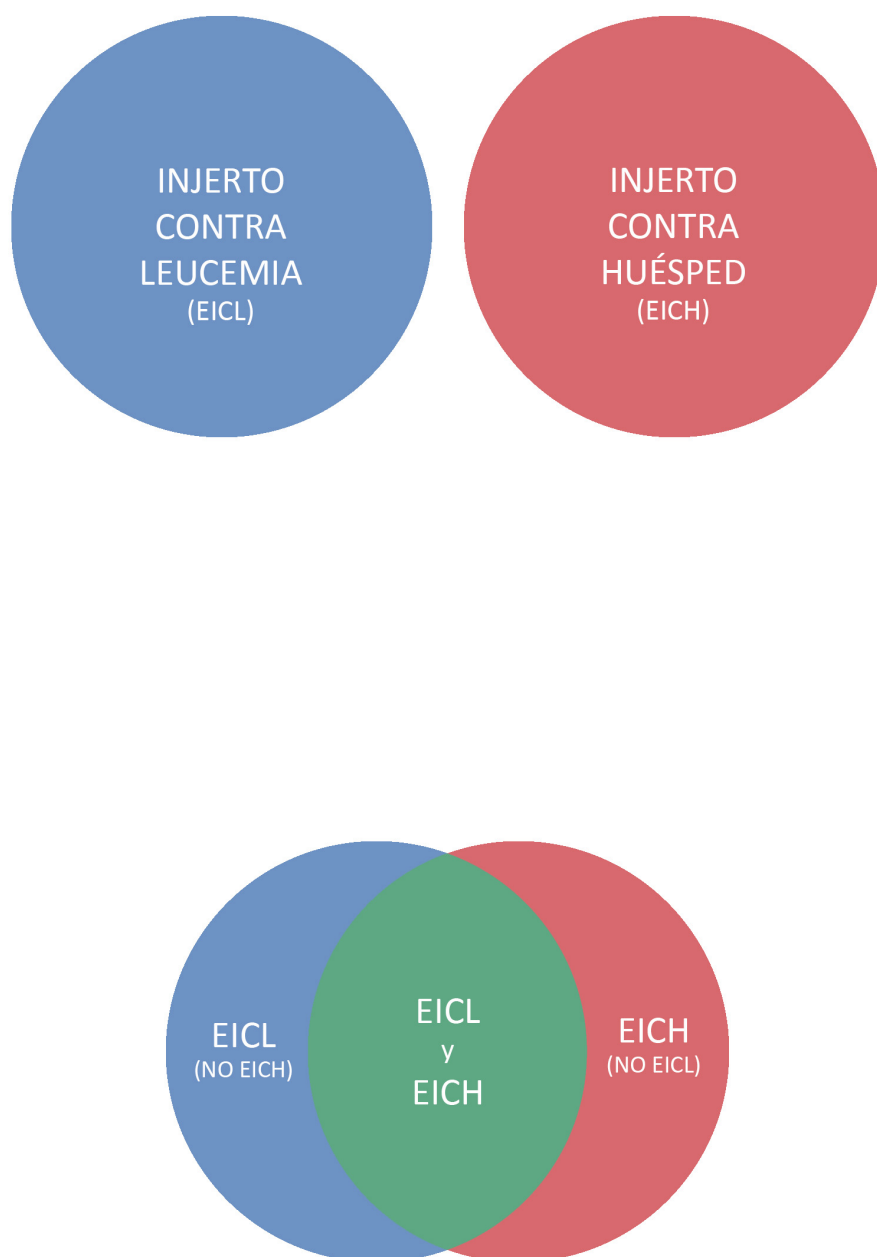
HIPÓTESIS DE TRABAJO

En el trasplante alogénico se infunden células de un donante a un receptor. Estas células del injerto pueden reconocer como extrañas las del paciente y producir un fenómeno de respuesta frente a las mismas, conocido como enfermedad de injerto contra huésped. Existe también otro efecto inmune de las células del donante frente a las células de la leucemia, efecto injerto contra leucemia que resulta beneficioso, ya que disminuye la recaída postrasplante. Se cuestiona si estos efectos están separados, es decir si se puede obtener un EICL sin tener EICH, o si por el contrario, el EICL y el EICH forman parte del espectro aloinmune del injerto y, necesariamente, se tienen que producir de manera conjunta.

Nuestra hipótesis defiende que aunque ambos efectos suelen coexistir en los pacientes que reciben un trasplante alogénico de progenitores, mediante estrategias de manipulación se puede conseguir, en parte, separar estos efectos. Una manera adecuada de poder demostrar esta hipótesis es crear una plataforma libre de EICH en la que generar un EICL mediante la infusión periódica de linfocitos del donante tras el trasplante. Para ello se estudiarán tres tipos de trasplantes: en primer lugar los trasplantes autólogos (por definición carecen de efecto aloinmune del injerto); en segundo lugar, el de los pacientes que han recibido un trasplante alogénico familiar idéntico sin manipular (sin técnicas de eliminación de linfocitos T del inóculo para evitar la EICH) y, por último, los pacientes que han recibido un trasplante alogénico familiar idéntico manipulado con selección de CD34⁺ junto con una mínima cantidad de linfocitos T en el inóculo para asegurar el injerto y posteriores infusiones periódicas de linfocitos del donante. Se compararán las recaídas en estos tres grupos para comprobar si las estrategias que buscan disminuir la EICH tienen más recaídas (los efectos EICH y EICL van unidos) o si estas son similares (puede existir EICL separado de la EICH).

Resolver esta cuestión permitirá, en un futuro, seleccionar la estrategia de trasplante a utilizar en cada paciente, atendiendo a las características tanto del paciente como de su enfermedad en el momento del trasplante.

Figura 6. Hipótesis de la tesis



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN

El trasplante de progenitores hematopoyéticos como tratamiento curativo en enfermedades malignas en la edad pediátrica es un campo aún no muy estudiado, a diferencia de lo que ocurre en la población adulta.

El objetivo fundamental del trasplante alogénico de progenitores en el tratamiento de hemopatías malignas es evitar la recaída de la enfermedad de base por el efecto injerto contra leucemia. La realidad es que la recaída postrasplante alogénico sigue siendo la primera causa de fallo del trasplante.

Aunque en los últimos años se ha reducido de forma sustancial, uno de los principales inconvenientes del trasplante de progenitores hematopoyéticos sigue siendo la toxicidad inherente al procedimiento, con una tasa de morbilidad no despreciable. La enfermedad de injerto contra huésped es uno de los problemas más relevantes relacionados con la toxicidad del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

La manipulación del inóculo para eliminar los linfocitos T inmunocompetentes es la manera más eficaz de evitar la EICH. Sin embargo, dicha estrategia se ha asociado a un mayor número de recaídas en pacientes adultos. Este tipo de procedimiento no ha sido evaluado en la población pediátrica, donde las características biológicas de las hemopatías malignas trasplantadas son distintas.

El motivo de este estudio es comprobar si la estrategia de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en pacientes pediátricos en dos tiempos (primero infundir las células progenitoras mediante un sistema de selección celular, y posteriormente realizar infusiones periódicas de linfocitos del donante) disminuye la incidencia de EICH, sin aumentar las recaídas (manteniendo el mismo EICL).

Existen pocos trabajos que hayan analizado la cinética y el patrón de recaída en pacientes pediátricos. Mediante este análisis podremos observar los factores de riesgo asociados y definir una población de mayor y/o menor riesgo de recaída postrasplante. Dado que la población está constituida por pacientes con diferentes tipos de leucemias que tienen diferencias biológicas relevantes, resulta evidente que se deben estudiar dichos factores por separado.

2. OBJETIVOS

Esta tesis tiene tres objetivos primarios, relacionados con la recaída postrasplante, y 4 objetivos secundarios.

1. Analizar el impacto sobre la recaída de las tres estrategias de trasplante hematopoyético de progenitores: trasplante autólogo, trasplante alogénico familiar idéntico sin manipular y trasplante familiar idéntico con manipulación del inóculo.
2. Analizar el impacto sobre la recaída de la estrategia de manipulación del inóculo en el trasplante alogénico familiar idéntico junto con la adición de linfocitos T del donante en el periodo postrasplante comparada con el trasplante alogénico familiar idéntico sin manipular.
3. Establecer la asociación entre EICL y EICH crónica en el trasplante alogénico.
4. Comparar el desarrollo de EICH aguda y crónica según la estrategia de trasplante alogénico utilizada. Comparar la asociación entre EICH crónica e EICL según las clasificaciones clásicas y del NIH (*National Institute of Health*).
5. Determinar la mortalidad relacionada con el procedimiento del trasplante.
6. Analizar la supervivencia libre de enfermedad y las variables asociadas.
7. Estudio de la reconstitución inmunohematológica y del quimerismo postrasplante.

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

1. TIPO DE ESTUDIO

Esta investigación se basa en la realización de un estudio retrospectivo. Se ha realizado revisando las historias clínicas de todos los pacientes trasplantados en la Unidad de Trasplante del Servicio de Oncohematología del Hospital Universitario Infantil del Niño Jesús por hemopatías malignas desde la apertura de la unidad, a principios de 1989 hasta fin del 2012 (24 años). Desde la creación de la unidad de trasplante hasta la actualidad, el número de trasplantes realizados cada año, así como la complejidad de los mismos, han ido aumentando de forma importante.

La eliminación del uso de irradiación corporal total en el acondicionamiento; el uso de sangre periférica como principal fuente de progenitores hematopoyéticos; el uso de donantes alternativos cuando se carece de donante familiar HLA idéntico, son algunos de los cambios que se han introducido en las estrategias de trasplante de la unidad.

Actualmente en esta unidad se realizan una media de 50 trasplantes al año (20% autólogos y 80% alogénicos).

La Unidad de Trasplante posee distintas acreditaciones que constatan la calidad de su trabajo: la acreditación CSUR (Centros, Servicios y Unidades de Referencia) por parte del Ministerio de Sanidad, y la acreditación JACIE (*Joint Accreditation Committee-ISCT and EBMT*). Forman parte de la EBMT (*European Society for Blood and Marrow Trasplantation*) y CIBMTR (*Center for International Blood and Marrow Transplant Research*) y han colaborado en la creación del GETH (Grupo Español de Trasplante Hematopoyético y terapia celular).

2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DEL ESTUDIO

2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para este estudio se ha considerado cada trasplante como un episodio. Es decir si un paciente se trasplanta y después recae, si el paciente se vuelve a recibir un trasplante, está considerado como dos episodios (el primer episodio termina cuando el paciente recae).

De los 349 trasplantes hematopoyéticos que se han realizado en la unidad por hemopatías malignas desde 1989 hasta fin de 2012 se han incluido aquellos que cumplían una de las siguientes premisas:

- Haber recibido un trasplante autólogo de progenitores.
- Haber recibido un trasplante alogénico familiar idéntico (12 de 12).
- Haber recibido un trasplante alogénico familiar casi idéntico (11 de 12).

Del total de los 349 trasplantes que se han realizado en la unidad por hemopatías malignas durante el periodo estudiado, se han seleccionado para este estudio 184 (un 52,7%). Estos 184 procedimientos corresponden a 166 pacientes. En el estudio, 148 pacientes (89%) recibieron un único trasplante y 18 recibieron dos trasplantes.

2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del estudio todos los pacientes trasplantados por otras patologías: enfermedades hematológicas no malignas, enfermedades de depósito o tumores sólidos.

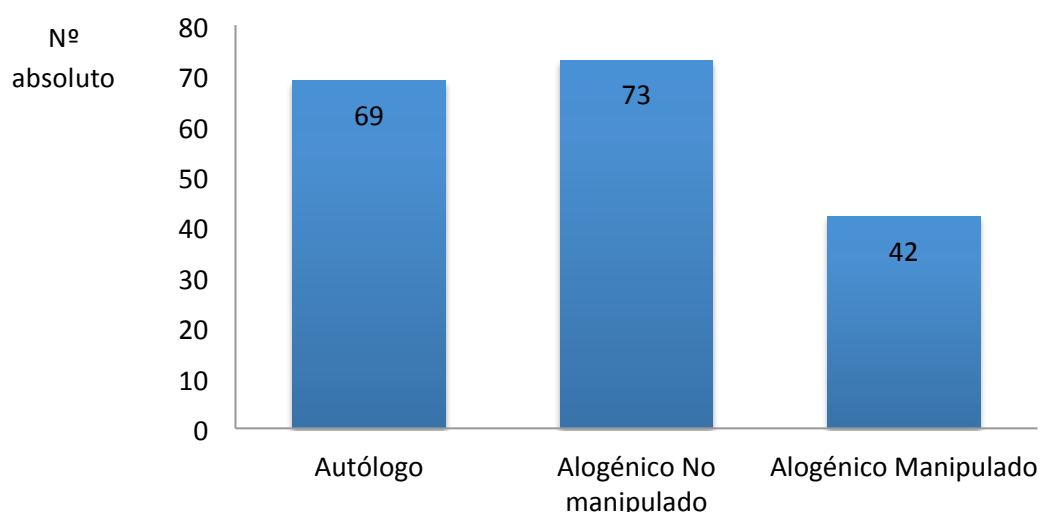
Dentro de los pacientes trasplantados por enfermedades hematológicas malignas se excluyeron los pacientes que se trasplantaron de un donante no emparentado y los que se trasplantaron de un familiar no idéntico (con más de una diferencia en el sistema HLA, así como los que se trasplantaron de un donante con solo un haplotipo idéntico).

3. CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES, JUSTIFICACIÓN DE COHORTE

Los pacientes incluidos en el estudio se han dividido en tres grupos según el tipo de trasplante al que hayan sido sometido.

- Autólogo: Este tipo de trasplante carece de aloinjerto, el donante y el receptor son el mismo paciente. El fundamento de este tipo de trasplantes es el de administrar altas dosis de quimioterapia para erradicar mediante los fármacos los clones leucémicos. En estos pacientes no podemos buscar efecto injerto contra a leucemia (EICL) ni efecto injerto contra huésped (EICH) ya que las células infundidas después de las altas dosis de quimioterapia son las del propio paciente.
Sería por tanto un grupo “control” en el que no hay EICH ni EICL.
- Alogénico familiar no manipulado: Este tipo de trasplante es un trasplante alogénico, es decir el donante y el receptor son distintas personas. Es la estrategia de trasplante alogénica clásica. En el trasplante alogénico sí juega un papel importante cómo se comporta el inóculo en el paciente al que se le infunden las células. Los pacientes que han recibido este tipo de trasplantes van a presentar fenómenos de aloinmunidad, expresados como efecto injerto contra leucemia (es el objetivo fundamental del trasplante) y también un efecto injerto contra huésped.
Como resumen simplista este grupo tendría EICL y EICH.
- Alogénico familiar manipulado: Estos pacientes también reciben un trasplante alogénico. En estos pacientes se realiza una selección de las células que van a ser infundidas al paciente, con objeto de eliminar la mayoría de los linfocitos T en el momento de la infusión, y en un periodo posterior se infunden pequeñas cantidades de linfocitos T. Esta estrategia de trasplante busca minimizar los efectos indeseables de la enfermedad injerto contra huésped, sin disminuir el efecto aloimmune de injerto frente a leucemia.
En estos pacientes se intenta separar el EICL de la EICH.

Figura 7. Distribución de pacientes según tipo de trasplante realizado



4. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

4.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

Se han recogido los siguientes datos referentes a la epidemiología de los pacientes que han sido sometidos a un trasplante hematopoyético de progenitores en la unidad:

- La edad en el momento del trasplante, expresada en años. Para el análisis se ha clasificado a los pacientes en lactantes cuando eran menores de dos años, niños (edades entre 2 y 12 años) y adolescentes (mayores de 12 años).
- El género.
- El peso del paciente en el momento del trasplante.
- Estado funcional: consiste en una valoración del estado general de los pacientes en el momento de realizar el trasplante. En este estudio se han recogido y analizado como si se tratara de una única escala funcional, aunque no valoran exactamente los mismos ítems.
 - Para pacientes menores de 16 años se ha utilizado la escala de Lansky (Anexo Tabla 1).
 - Para los pacientes de 16 años o más se ha utilizado el índice de Karnofsky (Anexo Tabla 2).

4.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD DE LOS PACIENTES

Además, se han recogido variables referentes a la enfermedad que presentaba cada paciente:

- Tipo de enfermedad: si era una enfermedad aguda o crónica. Se consideraron enfermedades agudas: la leucemia aguda tanto linfoblástica (LLA) como mieloblástica (LMA); y crónicas: la leucemia mieloide crónica (LMC), y la leucemia mielomonocítica crónica juvenil (LMMCJ).
- Estirpe de enfermedad: si el origen de la neoplasia era linfoide o mieloide.
- Diagnóstico: el tipo de hemopatía maligna que presentaba el paciente. Leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia mielomonocítica juvenil.
- Estatus al trasplante: primera, segunda, tercera remisión completa, sin remisión en el momento del trasplante y los pacientes que se trasplantaban con enfermedades crónicas.
- Estado de la enfermedad al trasplante (fase de enfermedad): Se consideró que el paciente se trasplantó en una fase precoz de la enfermedad si un paciente con una leucemia aguda se trasplantaba en primera remisión completa y los que, con enfermedades crónicas, se trasplantan con buen control de la enfermedad. Se consideró enfermedad avanzada cuando el paciente se trasplantaba en segunda remisión completa, en tercera o posterior remisión completa, y cuando se trasplantaba con enfermedad cuantificable (no remisión).

Tabla 16. Características epidemiológicas y de enfermedad de los pacientes del estudio

	AUTÓLOGOS	FAMILIARES NO MANIPULADOS	FAMILIARES MANIPULADOS	p entre los 3 grupos	p entre TPH alogénico
Pacientes	69	73	42		
Edad (años)	9 (1-16)	9 (1-19)	8 (1-16)	0,7	0,41
Grupos de edad					
• Lactante	9 (13,2%)	6 (8,2%)	8 (19%)	0,5	0,2
• Niño	44 (64,7%)	48 (65,8%)	26 (61,9%)		
• Adolescente	15 (22,1%)	9 (26%)	8 (19%)		
Género					
• Masculino	52 (74,4%)	44 (60,3%)	24 (57,1%)	0,08	0,74
• Femenino	17 (24,6%)	29 (39,7%)	18 (42,9%)		
Peso (Kg)	30 (9-89)	32 (8-77)	30 (8-73)	0,9	0,99
Lansky	90 (80-100)	100 (60-100)	100 (80-100)	**	**
Tipo Enfermedad					
• Aguda	69 (100%)	64 (87,7%)	39 (92,9%)	0,036*	0,74
• Crónica	-	9 (12,3%)	3 (7,1%)		
Estirpe					
• Linfoide	34 (49,3%)	53 (72,6%)	22 (52,4%)	0,01	0,03
• Mieloide	35 (50,7%)	20 (27,4%)	20 (47,6%)		
Diagnóstico					
• LLA	34 (49,3%)	53 (72,6%)	22 (52,4%)	0,001*	0,057*
• LMA	35 (50,7%)	13 (17,8%)	17 (40,5%)		
• LMC	-	6 (8,2%)	3 (7,1%)		
• LMMCI	-	1 (1,4%)	-		
Estatus al TPH					
• 1º RC	43 (62,3%)	23 (31,5%)	24 (57,2%)	0,0001*	0,026
• 2ºo+ RC, no RC	26 (37,3%)	43(58,9%)	15 (35,7%)		
• Crónicas	-	7 (9,6%)	3 (7,1%)		
Fase Enfermedad					
• Precoz	43 (62,3%)	30 (41,1%)	27 (64,3%)	0,014	0,017
• Avanzada	26 (37,3%)	43 (58,9%)	15 (35,7%)		

* En la tabla de contingencia del análisis mediante Chi cuadrado existen más del 20% de casillas con una frecuencia esperada inferior a 5. En estas condiciones los resultados de contraste no son fiables.

** No puede hacerse una comparación de medias cuando las medias tienen el mismo valor.

5. CARACTERÍSTICAS DEL PROCEDIMIENTO

Se han estudiado también distintas variables relativas al procedimiento de trasplante en sí mismo.

5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

- Número de trasplante: si el trasplante estudiado era el primero que se le realizaba al paciente o si, por el contrario, ya había recibido otro. Si había recibido un trasplante previamente de qué tipo fue (autólogo o alogénico).
- Fecha de trasplante: se clasificó en dos periodos, si el trasplante se realizó antes del año 2000 o si fue posterior.
- Compatibilidad HLA entre donante y receptor: si era totalmente compatible (12 de 12) o si presenta una diferencia (11 de 12).

El estudio del HLA de los pacientes y de los donantes se realizó en el Centro de Transfusión de la comunidad de Madrid (CTCM) por técnicas de baja resolución el HLA de clase I (para A, B y C) mediante SSO, y por técnicas de alta resolución para HLA de clase II mediante SBT.

5.2. ACONDICIONAMIENTO

- Tipo de acondicionamiento utilizado: si el acondicionamiento fue mieloablativo o de intensidad reducida.
- Si se utilizó o no irradiación corporal total (ICT).
- Si se utilizó o no fludarabina.

Los acondicionamientos de intensidad reducida se basan en fármacos que no sean muy mieloablativos, pero con mucho poder inmunosupresor, como la fludarabina. Con el tiempo, en la unidad, se han ido implementando los acondicionamientos de intensidad reducida en disminución de los mieloablativos.

El uso de la irradiación corporal total como parte del acondicionamiento ha ido disminuyendo progresivamente, hasta suprimirse por completo a finales de 2001.

5.3. FUENTE DE PROGENITORES

- Fuente de Progenitores Hematopoyéticos que se ha utilizado: médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical.

En la unidad, la fuente de progenitores hematopoyéticos más utilizada en la última década, para los pacientes con enfermedades hematológicas malignas, fue la sangre periférica movilizada con G-CSF.

Tabla 17. Principales características del procedimiento del trasplante

	AUTÓLOGOS	FAMILIARES NO MANIPULADOS	FAMILIARES MANIPULADOS	p entre los 3 grupos	p entre TPH alogénico
Pacientes	69	73	42		
Número de TPH					
• 1º TPH	69 (100%)	54 (74%)	40 (95,2%)	0,0001	0,04
• 2º TPH	0	19 (26%)	2 (4,8%)		
- 1º Autólogo		2	0		
- 1º Alogénico		17	2		
Estudio HLA	No procede				
• Idéntico 12/12		71 (97,3%)	37 (88,1%)		0,09
• Idéntico 11/12		2 (2,7%)	5 (11,9%)		
Periodo del TPH					
• Antes 2000	44 (63,8%)	36 (49,3%)	-	0,0001	0,0001
• Después 2000	25 (36,2%)	37 (50,7%)	42 (100%)		
Acondicionamiento					
• Mieloablatoivo	69 (100%)	65 (89%)	3 (7,1%)	0,0001	0,0001
• Intensidad reducida	-	8 (11%)	39 (92,9%)		
Irradiación Corporal					
• No	50 (72,5%)	43 (58,9%)	42 (100%)	0,0001	0,0001
• Sí	19 (27,5%)	30 (41,1%)	-		
Uso Fludarabina					
• No	69 (100%)	56 (76,7%)	2 (4,8%)	0,0001	0,0001
• Sí	0	17 (23,3%)	40 (95,2%)		
Fuente progenitores					
• Médula ósea	16 (23,2%)	13 (17,8%)	0	0,002*	0,003*
• Sangre periférica	53 (76,8%)	56 (76,7%)	42 (100%)		
• Cordón	0	5 (5,5%)	0		

* En la tabla de contingencia del análisis mediante Chi cuadrado existen más del 20% de casillas con una frecuencia esperada inferior a 5. En estas condiciones los resultados de contraste no son fiables.

6. PROCEDIMIENTO DE MANIPULACIÓN. SELECCIÓN POSITIVA DE CÉLULAS CD34⁺ MEDIANTE CliniMACS System®

Los pacientes que recibieron un trasplante alogénico se han dividido, a su vez, en aquellos en los que no se utilizó ninguna estrategia de manipulación del inóculo; y aquellos en los que se realizaron técnicas de selección celular en el inóculo.

El procedimiento de manipulación que se utilizó en todos los pacientes (42 pacientes) fue la selección positiva de progenitores hematopoyéticos (CD34⁺), con el sistema de CliniMACS® que se detallará a continuación.

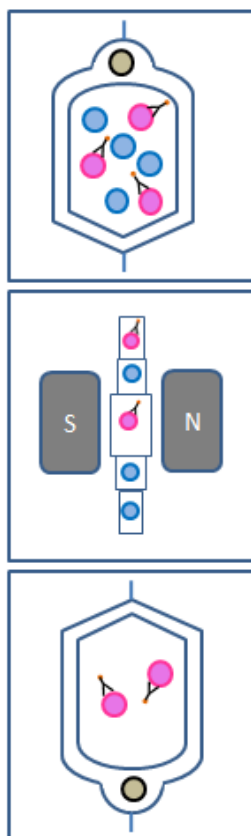
6.1. TECNOLOGÍA MACS PARA SELECCIÓN CELULAR

Se ha utilizado la tecnología MACS “MAGnetic Cell Sorting” (Miltenyi Biotec, Germany), para la selección CD34⁺ ya que permite la separación y selección de células mediante un campo magnético de alto gradiente, a través de un potente imán permanente y una columna de separación con una matriz ferromagnética.

Se marcan las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ obtenidas de la aféresis con un anticuerpo monoclonal murino antiCD34⁺ unido a una partícula superparamagnética de 50 nm de hierro-dextrano (óxido de hierro).

Cuando el campo magnético está activo las células marcadas magnéticamente se quedan retenidas en la columna que está magnetizada y así se separan de las células que no están marcadas. En un segundo tiempo, cuando se interrumpe el campo magnético las células que estaban retenidas por el imán son lavadas y se recogen en un compartimento diferente de las no marcadas (es la fracción de células CD34⁺).

Figura 8. Fundamento de CliniMACS®



6.2. EXPLICACIÓN DEL CliniMACS System®

El sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) utiliza la tecnología MACS para usos de aplicación clínica. Es el sistema utilizado para realizar la selección del material recogido de las aféresis de los pacientes.

El CliniMACS System está compuesto por:

- Un aparato controlado por ordenador (CliniMACS®^{plus} *Instrument*).
- Un software específico de selección CD34⁺.
- Un set de tubos estériles (CliniMACS *Tubing Sets*).
- Un reactivo magnético estéril (CliniMACS CD34 *Reagent*).
- Un tampón estéril (CliniMACS PBS/EDTA *Buffer*).

Los componentes básicos del CliniMACS®^{plus} *Instrument* son un ordenador integrado, una unidad de separación magnética, una bomba peristáltica, un sensor de líquido y válvulas de estrangulamiento. El ordenador integrado controla todos los componentes electromecánicos del aparato y guía el sistema para ejecutar los procesos. La unidad de separación magnética incorpora un imán y un soporte para la columna de selección. Durante la selección, la bomba peristáltica controla la velocidad de flujo a través del *Tubing Set*. El sensor del líquido controla el flujo de suspensión de células marcadas dentro del CliniMACS *Tubing Set*. Un total de once válvulas de estrangulamiento aseguran un flujo controlado durante todo el proceso. Todo el proceso se realiza dentro de un sistema cerrado y estéril.

Imagen 1. CliniMACS®^{plus} *Instrument*



6.3. PROCESO DE SELECCIÓN DE CÉLULAS CD34⁺ MEDIANTE EL CliniMACS System®

El intervalo entre la realización de la aféresis de los donantes familiares y los procesos de manipulación no fue superior a 24 horas en ningún caso. La muestra obtenida de la aféresis se conservó durante ese tiempo con anticoagulante (ACD-A) a temperatura ambiente.

Todo el procedimiento de manipulación de la aféresis (lavados, marcajes, incubación) fue realizado con las máximas medidas de esterilidad, en el interior de una cabina de flujo laminar tipo II (VBH 72 Compact E, Mazdo di Rho; Milan, Italia).

Antes de comenzar el proceso de manipulación, se comprobó el número de células que se habían conseguido de la aféresis. Los límites celulares para realizar el procedimiento de selección con un vial de anticuerpo antiCD34 son de 60×10^9 CNT (células nucleadas totales) y 6×10^8 CD34⁺.

6.3.1. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN ESTÉRIL

El kit de selección trae tres bolsas de tampón. Se añade a cada bolsa de 1 litro de CliniMACS PBS/EDTA *Buffer*, 50 ml de serolbúmina al 20% (Albuteín® 20% ,10g/50 ml, Grifols, Barcelona, España), es decir, 10 gramos en cada litro.

6.3.2. PREPARACIÓN DEL PRODUCTO INICIAL

La bolsa de la aféresis no es idónea para el procedimiento centrifugado (ya que es de un gran tamaño y no es segura, porque no es una bolsa completamente cerrada) por lo que se traspara a una bolsa de transferencia mediante una conexión estéril.

Se conserva en la bolsa de aféresis la parte que será destinada a congelar así como la parte de la que obtendremos los linfocitos que añadiremos a nuestro producto final, antes de infundir al paciente. Esta muestra se conserva en nevera durante el proceso de manipulación.

Se separa la bolsa de aféresis de la de transferencia con un sellado del cordón (dejando en el extremo de la bolsa de transferencia un segmento largo).

6.3.3. DILUCIÓN DEL PRODUCTO INICIAL

Se añade PBS (enriquecido con albúmina) al producto de la aféresis, que ya está en la bolsa de transferencia, hasta un volumen de 600 ml (el doble de PBS que de aféresis). La solución de PBS se había introducido en otra bolsa de transferencia previamente y se añade al producto inicial, mediante un sistema de conexión estéril que une ambas bolsas de transferencia. Una vez añadido el PBS al producto de aféresis, se separan ambas bolsas de transferencia dejando un cordón largo tras cortarlo en el sellador.

Se mezcla cuidadosamente el producto y se introduce en una centrífuga (KUBOTA 8910 Bunkyo-ku, Tokio, Japan), a 230 G, durante 15 minutos a temperatura ambiente, sin freno para no alterar el sedimento celular (en inglés, *pellet*) que se genera durante la centrifugación.

6.3.4. DESPLASMATIZAR

Tras la centrifugación, se une el cordón de la bolsa centrifugada al de una nueva bolsa de transferencia y se extrae la mayor cantidad posible de sobrenadante, utilizando un sistema de prensa que hace que el sobrenadante vaya hacia la nueva bolsa de transferencia y que en la antigua se quede el *pellet* celular.

Se separa la bolsa de transferencia que contiene el sobrenadante y se desecha. En la bolsa de transferencia que tiene el contenido celular hay un volumen de unos 90 ml. Si es un volumen menor se completará con PBS para llegar a un volumen final de 90 ml.

6.3.5. AÑADIR INMUNOGLOBULINAS INESPECÍFICAS

Se coloca en la bolsa de transferencia que contiene las células un *sampler* y añade 5 ml de inmunoglobulinas inespecíficas (Flebogamma® I.V 5%, Grifols, Barcelona, España), para bloquear las uniones inespecíficas y así aumentar la especificidad de la unión entre el antígeno y el anticuerpo.

Se deja incubar en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos.

6.3.6. MARCAJE MAGNÉTICO

El marcaje se realiza con un vial de CliniMACS CD34 *Reagent*, que cada vial contiene 7,5 ml de un coloide de hierro-dextrano conjugado a un anticuerpo monoclonal murino CD34 en tampón PBS/EDTA estabilizado con Polxamer 188.

En la bolsa de transferencia hay un volumen de 95 ml (incluye el producto inicial desplasmalizado y 5 ml de Flebogamma®).

Se inyecta en la bolsa de transferencia todo el vial CliniMACS CD34 *Reagent* (7,5ml), que contiene el anticuerpo antiCD34⁺, y se mezcla cuidadosamente.

Se deja incubar 30 minutos en agitación a temperatura ambiente en un agitador a 25 rpm (Helmer PFS 42, Noblesville, Indiana, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Es importante no exceder el tiempo de incubación. Durante este tiempo, al menos en dos ocasiones, agitar suavemente de modo manual la bolsa para asegurar una buena mezcla de las células.

6.3.7. LAVADO PARA RETIRAR EL EXCESO DE REACTIVO

Tras finalizar la incubación hay que realizar varios lavados para eliminar el exceso de reactivo.

Para realizar el lavado, debe completarse el volumen de la bolsa que contiene las células con PBS hasta un volumen de 600cc. La bolsa que contiene las células no será válida para centrifugar porque ya está perforada. Así que se utiliza una nueva bolsa de transferencia que se llena con 470 ml de PBS. Esta bolsa se une a la bolsa que contiene las células marcadas y tras pasar parte del PBS a la bolsa que contiene las células, se devuelve todo el contenido a la bolsa del PBS (que es la que no está perforada). Para lavar la bolsa que contenía las células, y no perder contenido celular, se introduce el volumen restante hasta 600 ml de PBS por el *sampler* y se pasa a la nueva bolsa de transferencia (contendrá PBS y las células marcadas hasta un volumen final de 600 ml). Se sella la bolsa y se corta dejando un cordón largo.

Se centrifuga la bolsa a 230 G, durante 15 minutos a temperatura ambiente y sin freno.

Tras la centrifugación se une el cordón de la bolsa centrifugada al de una nueva bolsa y con el sistema de prensa se extraerá la mayor cantidad de sobrenadante (unos 520 ml). Se sellará la bolsa dejando un cordón largo y se desechará la bolsa que contiene el plasma.

Se repite un segundo lavado añadiendo PBS desde otra bolsa de transferencia con el volumen que se haya desplasmalizado. Esa bolsa se unirá mediante conexión estéril a la bolsa que contiene las células (el volumen final de la bolsa no debe superar los 600 ml). Se centrifuga de forma similar.

6.3.8. PREPARACIÓN DEL PRODUCTO PRESELECCIÓN

Tras la centrifugación, se une el cordón de la bolsa de transferencia centrifugada al de una nueva bolsa de transferencia y se extrae la mayor cantidad posible de sobrenadante. El volumen de las células marcadas debe ser inferior a 150 ml. Se sella la bolsa dejando cordón corto.

Se añade PBS mediante un *sampler* en la parte más lateral de la bolsa de transferencia PBS hasta ajustar a un volumen de 150 ml.

Se resuspenden suavemente las células en el volumen final de 150 ml (este el volumen mínimo recomendado para trabajar en el CliniMACS®). Con este volumen se asegura que el número de células que van a pasar por la columna no tenga una concentración superior a 2×10^8 células/ml.

6.3.9. OBTENCIÓN DE MUESTRA PARA RECuento CELULARIDAD (CONTROL Pre-MACS)

Se toma una muestra para realizar el control de calidad, recuento celular.

Mientras se conoce el resultado del recuento (que es preciso conocerlo antes de introducir el producto en el CliniMACS®) se deja la bolsa en el agitador a temperatura ambiente.

6.3.10. PROCESO DE SELECCIÓN EN EL CliniMACS®

Justo antes de colocar la bolsa en el CliniMACS, se introducen 50 ml de aire estéril dentro de la bolsa que contiene las células.

Se coloca el sistema CliniMACS *Tubing Sets*, que contiene una bolsa con precinto verde (bolsa de cebado, *Priming Waste Bag*), dos bolsas unidas por un conector: bolsa de fracción negativa (*Negative Fraction Bag*) y bolsa de desecho de *buffer* (*Buffer Waste Bag*).

Hay que colocar una bolsa de criopreservación pequeña de 30-70 ml de capacidad (*Cell Collection Bag*), que será la bolsa que recogerá la fracción positiva (bolsa de recogida de células).

Se coloca la bolsa con las células marcadas en la parte superior del CliniMACS^{plus} *Instrument* conectada a través de un filtro con cámara hacia arriba que asegurará el flujo continuo del producto al sistema.

Se siguen las instrucciones del programa "CD34 SELECTION 1", y se procesa la muestra de aféresis manipulada.

6.3.11. OBTENCIÓN DE MUESTRAS (CONTROL Post-MACS)

De la fracción positiva se recogen dos muestras, una para viabilidad celular y otra para estudio de subpoblaciones.

De la fracción negativa (todo lo que no es CD34⁺) se extrae muestras para estudio microbiológico (dos hemocultivos, uno aerobio y otro anaerobio).

6.3.12. RECOGIDA DE LA MUESTRA DE SELECCIÓN Y ADICIÓN DE LINFOCITOS CALCULADOS

El CliniMACS ha separado mediante el sistema de imantación y desimantación las células CD34⁺ y las ha recogido en una bolsa.

Se añade a la muestra obtenida de la selección CD34⁺, el volumen de muestra de aféresis reservada sin manipular, que contenga 3×10^5 linfocitos T/Kg de peso del receptor, para asegurar un buen injerto.

6.3.13. CRIOPRESERVACIÓN PARA FUTURAS INFUSIONES DE LINFOCITOS DEL DONANTE (ILD)

Antes de iniciar el proceso de selección CD34⁺, se separó una cantidad de la aféresis para poder realizar proceso de criopreservación, que se utilizará para posteriores infusiones .

Para conservar las muestras es necesario añadir una solución criopreservante, que contiene un 80% de plasma (autólogo o alogénico compatible con el receptor) y un 20% de dimetilsulfóxido (DMSO). Tanto la mezcla con el conservante como el material de aféresis para criopreservar se guardan unos 20 minutos en una nevera a 4°C. Pasado ese tiempo se introducen en criotubos de 1 ml que contendrán conservante y contenido de la aféresis en una proporción 1:1.

Los criotubos se introducen en un congelador biológico, CM-2000 (Carbueros Metallicos/Air Products, Madrid; España) que consigue una congelación programada con descenso de temperatura controlada. Cuando se alcanza una temperatura de -120°C se traspasan los criotubos a un tanque de nitrógeno líquido. Esos criotubos se conservarán congelados a una temperatura entre -186 y -196°C hasta su posterior utilización.

El proceso de descongelación de los criotubos se realizará en el momento en el que se haya programado la ILD mediante una rápida descongelación del criotubo en agua purificada a 37°C. El contenido descongelado del criotubo se resuspende en suero salino fisiológico y se administra inmediatamente al paciente.

6.4. CITOMETRÍA DE FLUJO DURANTE EL PROCEDIMIENTO DE SELECCIÓN CD34⁺

Durante todo el procedimiento de la selección interesa saber, por un lado, la cantidad de células (sobre todo progenitoras) y también las subpoblaciones linfocitarias que hay en la aféresis del donante; y, por otro lado, conocer la viabilidad de dichas células. Es importante estudiar estos datos antes y después de la manipulación en el producto final (fracción CD34⁺, que está en la *Cell Collection Bag*).

Tanto la viabilidad como el estudio de subpoblaciones linfocitarias se estudia por citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales de Beckman Coulter, (Fullertown, CA, USA) o de Becton Dickinson (Becton Dickinson Biociencias), en el citómetro de flujo Coulter Epics Elite (Coulter Corporation, Hialeah, Florida, USA) o en citómetro Facs Canto II (Becton Dickinson Biociencias).

Para el estudio de subpoblaciones linfocitarias se utilizan anti CD34, CD3, CD19, CD45 y para la viabilidad, además, Anexina y 7- Amino-ActinomicinaD (7-AAD).

El estudio de viabilidad consiste en demostrar el porcentaje de celularidad de la muestra de células que están muertas (estas células no tienen la membrana celular íntegra por lo que permiten el paso a través de los poros de colorantes como el 7-AAD, que se van a unir al DNA) y de las que son apoptóticas (que no serán viables tampoco, que se marcarán con la anexina).

Figura 9. Hoja de recogida del procedimiento de selección CD34⁺ con CliniMACS®

Página 1

Hospital Infantil Universitario Niño Jesús **Comunidad de Madrid**
SaludMadrid

SELECCIÓN DE CD34 CON CLINIMACS®

ETIQUETA DONANTE

Fecha: _____
 Nº donación: _____ Grupo donante (ABO y Rh): _____
 Comprobación Grupo ABO y Rh del donante: _____

Flebogamma: LOTE: _____ Caducidad: _____
PBS: _____ Caducidad: _____
KIT SELECCIÓN: _____ Caducidad: _____

ANTICUERPO ANTICD34: _____
 REF: _____
 LOT: _____
 CADUCIDAD: _____

ETIQUETA RECEPTOR

Peso del receptor: _____
 Grupo receptor (ABO y Rh): _____
 Volumen de la aféresis= peso (a) -32 (bolsa)= ml

Albúmina 1: LOTE: _____ Caducidad: _____
Albúmina 2: LOTE: _____ Caducidad: _____
Albúmina 3: LOTE: _____ Caducidad: _____

	Volumen (µl)	Células/ µl	Células totales	CD34 (%)	CD34 / µl	CD34 TOTALES	CD34 /kg x10 ⁵	CD3 (%)	CD3 / µl	CD19 (%)	CD19/ µl	1: siempre menor de 60x10 ⁵ cels totales
AFÉRESIS			(1)			(1)						
PREMACS												
FRACCIÓN +												
FRACCIÓN -												

por kit de anticuerpo y 6x10⁵ cels CD34
VIABILIDAD: CMN: 7AAD⁺/Anexina⁻: _____%; 7AAD⁺/Anexina⁺: _____%.
VIABILIDAD post manipulación: CMN: 7AAD⁺/Anexina⁻: _____%; 7AAD⁺/Anexina⁺: _____%.
 Código proceso: _____
 Se infunden _____ µl de aféresis para completar _____ células CD3⁺/kg peso

CONTROLES:
 Número de laboratorio de los cultivos: _____

Firma Técnico: _____ Firma Responsable Servicio de Transfusión: _____

Documento	Hoja Selección de CD34 con Clinimacs®	Código	SET-IM-052
Aprobado	Responsable Servicio de Transfusión	Edición	D
Fecha	31-08-2012	Página	2 de 2

Página 2

ETIQUETA INICIAL REDMO (EN CASO DE DONANTE NO EMPARENTADO):

ETIQUETA INICIAL:

FIRMA:

FIRMA:

ETIQUETA FINAL:

FIRMA:

FIRMA:

OBSERVACIONES/INCIDENCIAS:

Documento	Hoja Selección de CD34 con Clinimacs®	Código	SET-IM-052
Aprobado	Responsable Servicio de Transfusión	Edición	D
Fecha	31-08-2012	Página	2 de 2

7. CARACTERÍSTICAS DEL INÓCULO

Antes de infundir las células del inóculo mediante citometría de flujo se caracterizaron distintos tipos celulares, que se expresan en la tabla de abajo en forma de mediana y rango.

- Número de células mononucleadas (CMN).
- Número de células CD34⁺ infundidas.
- Número de células CD3⁺ infundidas.

Tabla 18. Celularidad del inóculo

	AUTÓLOGOS	FAMILIARES NO MANIPULADOS	FAMILIARES MANIPULADOS	p entre los 3 grupos	P entre TPH allogénico
Pacientes	69	73	42		
CMN (x10 ⁸)/Kg	6,4 (0,48-9,23)	3,8 (0,08-23,3)	-	*	*
CD34 ⁺ (x10 ⁶)/Kg	5 (0,38-35)	6,075 (0,1-34,82)	5,26 (1,4-39,9)	0,17	0,1
CD3 ⁺ (x10 ⁵)/kg	-	4718 (0,01-13800)	3 (0,04-3)	*	0,0001

* No se puede calcular

Los pacientes que recibieron un trasplante alogénico manipulado, eran pacientes más recientes y la cuantificación celular se hizo en células progenitoras (CD34⁺) y no en células mononucleadas totales.

La cuantificación de linfocitos T (CD3⁺) no tiene sentido en los trasplantes autólogos, ya que en ellos estos linfocitos no van a generar ningún tipo de problema de inmunidad, puesto que son sus propios linfocitos T los que serán reinfundidos.

Por otro lado, dentro de los pacientes que recibieron un trasplante de progenitores hematopoyéticos con manipulación del inóculo, comentar que, a partir del año 2007 se comenzó a añadir una cantidad fija de linfocitos T hasta completar una cantidad de 3x10⁵ linfocitos T/Kg. Los pacientes que recibieron un trasplante con manipulación del inóculo antes de esa fecha, recibieron la infusión tras la selección CD34⁺ con los linfocitos T que quedaron residuales tras el procedimiento. La razón para añadir una cantidad de linfocitos T de forma establecida, fue que, en los primeros 11 pacientes en los que se realizó esta técnica de eliminación de linfocitos T, se produjeron en 2 fallos de injerto (18%). En 31 de los 42 pacientes se añadió una cantidad de linfocitos T al inóculo tras la manipulación. Dos de los 31 pacientes a los que se les añadieron linfocitos T tras la selección CD34⁺ recibieron una dosis inferior a 3x10⁵/Kg; uno fue el primer paciente al que se le añadieron linfocitos T, (se añadieron hasta completar 2,5x10⁵/Kg) y el otro paciente, al que solo se le añadieron 10⁵/Kg porque existía una disparidad entre el donante y el receptor, para disminuir el riesgo de EICH.

8. **INJERTO HEMATOPOYÉTICO**

Para los datos de injerto se han utilizado estas definiciones:

- **Injerto leucocitario:**
Se consideró día de injerto leucocitario al primero de los tres días en los cuales el paciente presenta más de 500 leucocitos/ μL .
- **Injerto plaquetar:**
Se consideró día de injerto plaquetar al primero de los tres días en los que el paciente presentaba más de 20.000 plaquetas/ μL sin requerimientos transfusionales.
- **Fallo de injerto primario:**
Un paciente presenta fallo primario de injerto si no se ha alcanzado recuentos de neutrófilos 500/ μL , de plaquetas $> 20.000/\mu\text{L}$ y de hemoglobina $> 8\text{g/dL}$ automantenidos en el día +28 postrasplante.
- **Fallo de injerto secundario:**
Se consideró fallo secundario del injerto a la pérdida, de al menos, dos líneas celulares previamente implantadas y funcionales.

Todos los pacientes que recibieron un trasplante autólogo consiguieron recuperación leucoplaquetar.

Dentro del grupo que recibió un trasplante alogénico se excluyeron del análisis de recuperación leucoplaquetar 6 pacientes que fallecieron antes del mes postrasplante. Todos los pacientes consiguieron injerto leucocitario. De los analizados, dos pacientes no consiguieron alcanzar injerto plaquetar (ambos presentaron una recaída precoz postrasplante).

Tabla 19. Recuperación hematológica postrasplante en los distintos tipos de trasplante

Día de injerto	Autólogo	Alogénico No manipulado	Alogénico Manipulado	Nivel de significación p
Injerto leucocitario	11 (4 - 45)	13 (7-37)	13 (10-18)	0,0001
Injerto plaquetar (>20.000)	13 (9 - 73)	13 (7-31)	12 (7-36)	0,1
Injerto plaquetar (>50.000)	20 (12 - 180)	18 (10-106)	17 (9-62)	0,04
Injerto plaquetar (>100.000)	52 (15 - 365)	30 (12-106)	25 (9-300)	0,07

Nota: entre los dos tipos de trasplante alogénico no existieron diferencias estadísticamente significativas.

9. INFUSIÓN DE LINFOCITOS DEL DONANTE

9.1. CONDICIONES PARA LA ADMINISTRACIÓN DE ILD

Las ILD se obtuvieron en el momento de realización de la aféresis de progenitores. Se conservaron criopreservadas hasta el momento de su utilización.

Las ILD se administran de forma programada mensualmente, a partir del mes postrasplante. Las condiciones para la administración de ILD fueron: no presentar EICH, que el paciente no tenga quimera completa y hasta un máximo de 6 ILD.

9.2. NÚMERO DE PACIENTES CON ILD

De los 42 pacientes que recibieron un trasplante con manipulación del inóculo, 37 (88%) recibieron ILD como parte de la estrategia de trasplante para potenciar el EICL.

Los motivos de los cinco pacientes que no recibieron ILD fueron: en dos pacientes por la presencia de EICH aguda en el momento de la primera infusión de ILD, un paciente porque presentó una leucemia refractaria, otro paciente falleció antes del mes postrasplante y otro paciente presentó recuperación hematológica autóloga.

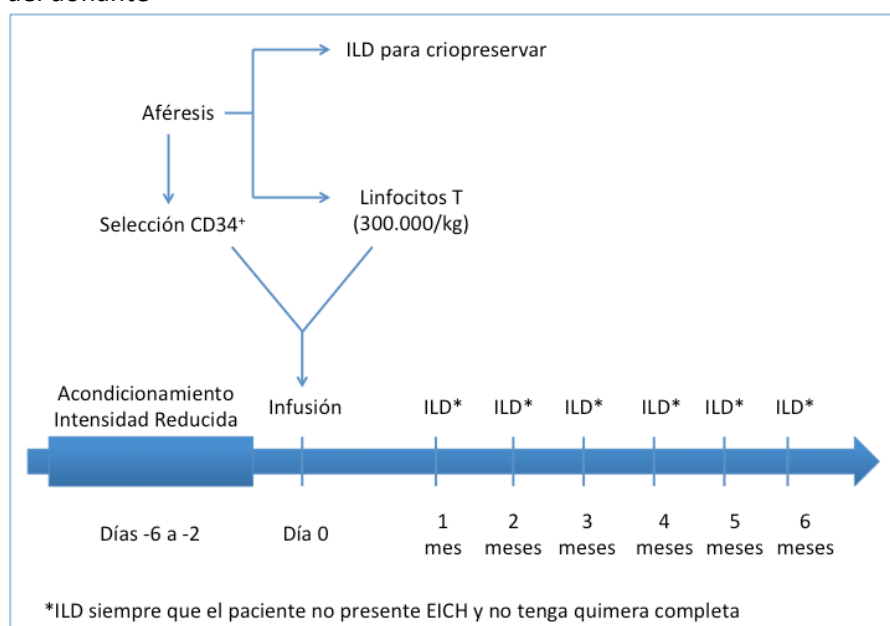
9.3. NÚMERO DE ILD POR PACIENTE

La mediana de número de ILD en los pacientes fue de 2 (rango 0-6).

La dosis de linfocitos en cada ILD fue de $1 \times 10^6/\text{Kg}$.

Se han excluido del análisis del número de ILD realizadas y del número de linfocitos por ILD a tres pacientes que recibieron ILD como parte de tratamiento de la recaída de la leucemia postrasplante (dos con recaída franca y otro era un paciente con una LMC que presentó biología molecular positiva que se negativizó con el tratamiento con linfocitos del donante).

Figura 10. Estrategia de trasplante alogénico con manipulación del inóculo e infusión de linfocitos del donante



ILD: Infusión de linfocitos del donante. EICH: Enfermedad de Injerto Contra Huésped

10. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED

10.1. CLASIFICACIÓN DEL TIPO DE EICH

La presencia de enfermedad de injerto contra huésped en los pacientes se ha clasificado según la forma clásica. Se consideró EICH aguda a aquella que se producía antes del día + 100 del trasplante y crónica la que se producía después.

Además se clasificó a todos los pacientes que recibieron un trasplante alogénico de acuerdo a los grupos que se establecieron Cho y colaboradores⁽¹¹⁶⁾, basándose en el sistema de clasificación propuesto por NIH, que separa a los pacientes en distintos grupos: los que no presentan EICH, los que teniendo alguna forma de EICH aguda no presentan crónica y los que presentan alguna forma de EICH crónica.

Grupos de clasificación de EICH según NIH modificada por Cho y colaboradores:

- Grupo 1: el paciente no presenta EICH, o solo presenta EICH aguda grado 1.
- Grupo 2: El paciente solo presenta EICH aguda clásica, sin presentar EICH crónica.
- Grupo 3: El paciente presenta otras formas EICH aguda distintas a la clásica, es decir EICH aguda persistente, recurrente o aguda de inicio tardío, sin presentar EICH crónica.
- Grupo 4: El paciente presenta EICH crónica clásica (con o sin EICH aguda previa).
- Grupo 5: El paciente presenta formas *overlap* o solapadas, con signos a la vez de aguda y crónica.

10.2. ESTADIFICACIÓN DE LA GRAVEDAD DE LA EICH

- EICH Aguda: El grado de afectación de la EICH aguda se realizó según la gradación vigente (Glucksberg modificada, ver Tabla 8).
- EICH Crónica: Para la EICH crónica se utilizó además de la clasificación del grupo de Seattle (limitada y extensa, ver tabla 10). Al tratarse de un estudio retrospectivo, no se disponían de datos suficientes para poder utilizar el sistema de gradación del NIH del consenso⁽¹¹⁶⁾.

11. QUIMERISMO

El estudio de quimerismo se realizó en el Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid (CTCM) hasta el año 2010. A partir de esa fecha el Laboratorio de Oncología del Hospital del Niño Jesús se encargó de realizar los estudios de quimerismo.

Las técnicas utilizadas para la determinación del quimerismo se han basado fundamentalmente en técnicas de estudio de microsatélites (STR, del inglés *Short Tandem Repeat*), si bien los primeros pacientes se estudiaron con otras técnicas.

De forma rutinaria, se estudió el quimerismo tanto del donante como del receptor previa la realización del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Se consideró quimerismo completo cuando el paciente tenía al menos un 99% de la celularidad del donante. En caso contrario, se definió como quimerismo mixto.

Los estudios de quimerismo se realizaron en sangre periférica. El estudio se realizó en células nucleadas totales (CNT) y en la subpoblación linfocitaria CD3⁺.

El esquema de monitorización del quimerismo fue:

- Periodo postrasplante inmediato (cuando se inicia recuperación leucocitaria/injerto leucoplaquetar estable (entre uno y dos meses postrasplante).
- Mensualmente hasta los seis meses.
- Cada tres meses hasta los dos años postrasplante.

Para el estudio nos centraremos, además de en el quimerismo precoz (periodo postrasplante inmediato), en el quimerismo a los tres meses, a los seis meses, al año y a los dos años.

En el caso de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico con manipulación del inóculo, resultó fundamental conocer el estado del quimerismo previo a cada infusión de linfocitos del donante, ya que si el paciente se encontraba en quimera completa dichas ILD se suspendían. Las ILD se administraron a los pacientes de forma programada, no buscando una conversión del quimerismo.

12. RECONSTITUCIÓN INMUNE

El estudio de reconstitución inmune se realizó mediante citometría de flujo multiparamétrica, utilizando el citómetros de flujo tipo EPIC Elitec (Beckman Coulter) hasta el 2007 y posteriormente el citómetro FACS CANTO II (Becton Dickinson).

Estos estudios se llevaron a cabo, inicialmente, en el Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid (CTCM); hasta el 2004 que se realizaron en el Laboratorio de Oncología del Hospital Infantil Universitario del Niño Jesús.

Las subpoblaciones linfocitarias que se recogieron fueron:

- Células Natural Killer (CD45⁺,CD56⁺, CD3⁻).
- Linfocitos T totales (CD45⁺,CD3⁺,CD56⁻).
- Linfocitos T colaboradores (CD45⁺,CD3⁺,CD56⁻,CD4⁺).
- Linfocitos T citotóxicos (CD45⁺,CD3⁺,CD56⁻,CD8⁺).
- Linfocitos B (CD45⁺,CD19⁺,CD20⁺).

Los momentos de estudio de la reconstitución inmune fueron:

- Periodo inmediato postrasplante (entre el mes y los dos meses tras la infusión).
- Tres meses postrasplante.
- Seis meses postrasplante.
- Un año postrasplante.
- Dos años postrasplante.

El número absoluto de las diferentes subpoblaciones leucocitarias se calculó mediante el producto de leucocitos totales medido en el analizador hematológico y el porcentaje de cada población evaluado por citometría de flujo.

Al tratarse de un estudio retrospectivo con un amplio periodo de pacientes incluidos, no disponemos de los datos de reconstitución inmune de todos los pacientes.

Tabla 20. Pacientes con estudio de reconstitución inmune.

Tiempo de RI	Nº total de pacientes con estudio de RI	Pacientes con TPH autólogo con estudio de RI (de los 69 TPH)	Pacientes con TPH alogénico No manipulado y estudio RI (de los 73 TPH)	Pacientes con TPH alogénico manipulado y estudio de RI (de los 42 TPH)
+30-60 días	58	5	16	37
+90 días	50	5	11	34
+180 días	42	5	8	29
+1 año	45	9	8	28
+2 años	32	6	4	22

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos. RI: Reconstitución inmune

13. RECOGIDA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

13.1. RECOGIDA DE DATOS

La recogida de datos se realizó con el programa de datos Excel de Microsoft (Microsoft Corp., Redmond, WA) donde se recogieron los siguientes datos:

- Características del paciente y su enfermedad: edad, género, valoración funcional, fecha de diagnóstico, tipo de enfermedad, estirpe, diagnóstico, fase de la enfermedad al trasplante, tiempo en primera remisión completa, tiempo hasta el trasplante, fecha del trasplante.
- Características del procedimiento: tipo de trasplante, número de trasplante, trasplante previo, tiempo desde el trasplante previo, fármacos utilizados para el acondicionamiento, tipo de acondicionamiento, irradiación corporal total, uso de timoglobulina, uso de fludarabina, fuente de progenitores, manipulación del inóculo, tipo de manipulación, existencia de donante, tipo de donante, celularidad CMN infundida, celularidad CD34⁺ infundida, celularidad CD3⁺ infundida.
- Características del injerto: injerto leucocitario y día, injerto plaquetar y día de injerto plaquetar con más de 20.000 plaquetas/ μ L, día con más de 50.000/ μ L y con más de 100.000/ μ L, si se ha producido fallo de injerto y si éste ha sido fallo de injerto primario o fallo de injerto secundario.
- Datos de recuperación inmune postrasplante: NK, LT totales, LT CD4⁺, LT CD8⁺ y LB en el día +30 o +60 (recuperación precoz), en el día +90, en el +180, en 1 año postrasplante y en 2 años postrasplante.
- Datos referentes al quimerismo: quimerismo en CNT y en subpoblación CD3⁺ el día +30 o +60 (quimerismo precoz), en el día +90, en el +180, en 1 año postrasplante y en 2 años postrasplante.
- Datos referentes a la infusión de linfocitos postrasplante (ILD): realización de ILD, número de ILD realizada y número total de linfocitos infundidos (suma de todas las ILD), aparición o no de EICH aguda tras la infusión de linfocitos, tiempo desde la ILD hasta la aparición de EICH aguda y grado de EICH aguda tras la ILD.
- Datos referentes a la Enfermedad de Injerto Contra Huésped: EICH aguda, grado EICH aguda, tiempo hasta el EICH aguda, EICH crónica, tiempo hasta EICH crónica, tipo de EICH crónica, severidad del EICH crónica, clasificación del paciente según los criterios NIH modificados.
- Datos referentes a la recaída: recaída, tiempo hasta la recaída, tipo de recaída.
- Estatus del paciente: si el paciente está vivo en el momento de concluir el estudio (31 de diciembre de 2012), si ha fallecido fecha de la muerte y causa de la muerte (si es por enfermedad o mortalidad relacionada con el trasplante).
- Por último se ha recogido si el paciente ha presentado algún evento (entendiendo por evento, la recaída o la muerte), el tiempo que el paciente ha estado libre de eventos y el tiempo de seguimiento.

13.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La descripción de variables cuantitativas se ha realizado con índices de tendencia central y de dispersión, basadas en ordenaciones (mediana y amplitud mediante rango) ya que no cumplían condiciones de normalidad. La descripción de variables categóricas se ha realizado con frecuencias absolutas y relativas en porcentajes. Su representación gráfica se hace con diagramas de barras.

Las relaciones entre variables categóricas se han analizado mediante la comparación de proporciones con la prueba de Chi-cuadrado de Pearson, siempre que existan menos del 20% de casillas de la tabla de contingencia con frecuencias esperadas menor de 5. Para la comparación de dos variables dicotómicas se ha utilizado la prueba exacta de Fisher bilateral en el caso de no poder aplicarse la prueba Chi-cuadrado de Pearson.

La normalidad de las variables, que nos confirmará la posibilidad de utilizar pruebas paramétricas en caso de cumplirse, o pruebas no paramétricas si no se cumple, se ha evaluado con la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de significación de Lilliefors para muestras grandes, o mediante la prueba de Shapiro-Wilks para muestras pequeñas. La igualdad de varianzas se ha analizado con la prueba de Levene.

La relación entre una variable exposición categórica y una respuesta cuantitativa se ha analizado mediante la comparación de medias. Para la comparación de dos medias se ha utilizado la prueba t de Student-Fisher para muestras independientes, si se cumple la condición de normalidad. Según cumplan o no la igualdad de varianzas se ha empleado la prueba t de Student-Fisher para grupos independientes para varianzas homogéneas o para varianzas no homogéneas, respectivamente. En caso de no cumplir la condición de normalidad, la comparación de dos medias se ha realizado con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. La comparación de más de dos medias se ha realizado mediante el análisis de la varianza (ANOVA), en el caso de cumplirse las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas. En caso de no cumplirse estas condiciones se ha realizado con la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis.

Las variables cuantitativas se transformaron en variables categóricas, en función de si presentaban un valor mayor o menor de la mediana para el estudio de probabilidades.

El análisis estadístico de variables categóricas con variables respuesta tiempo a un evento (de supervivencia) se ha realizado con el métodos de Kaplan-Meier del análisis de supervivencia, utilizando la prueba log rank (Mantel Cox) y gráficos de supervivencia. El análisis de predictores cuantitativos con respuestas de supervivencia se ha realizado con la regresión de riesgos proporcionales de Cox, utilizando la prueba de Wald y el Hazard Ratio (HR) con su intervalo de confianza del 95%.

El análisis estadístico de los datos se ha realizado utilizando el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Se han considerado significativos los valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA RECAÍDA POSTRASPLANTE

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA RECAÍDA POSTRASPLANTE

Un total de 81 recaídas se produjeron tras los 184 trasplantes (44%). La mediana de tiempo hasta la recaída fue de 3 meses (intervalo 1–72 meses). La probabilidad de recaída fue de $50 \pm 5\%$.

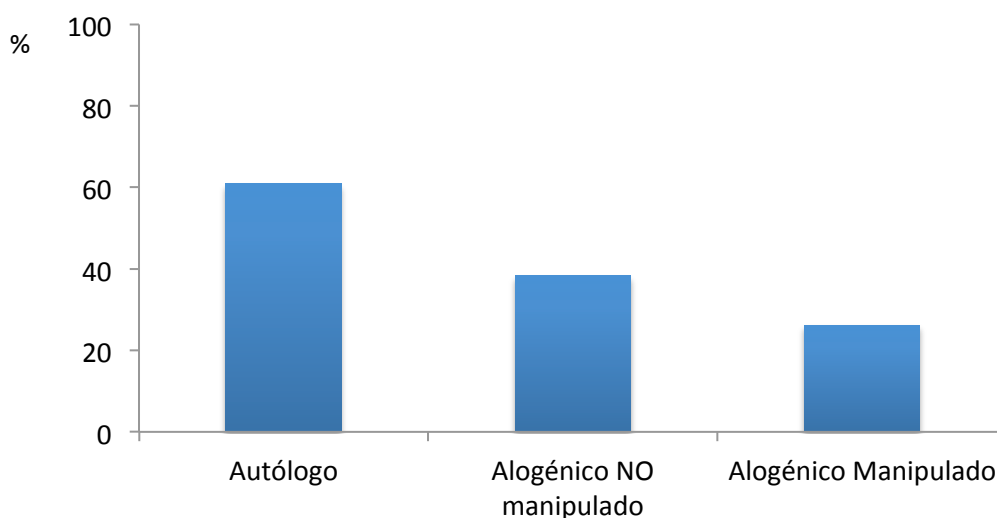
De los 69 pacientes que recibieron un trasplante autólogo, 42 recayeron (60,9%). La mediana de recaída fue de 6 meses (1-72). La probabilidad de recaída fue de un $65 \pm 6\%$. Todas las recaídas postrasplante fueron en médula ósea (un paciente presentó recaída además en otra localización) y no consta información sobre la localización de la recaída en 5 pacientes.

Del total de los 115 trasplantes alogénicos que se realizaron, recayeron 39 pacientes (33,9%). La mediana de recaída fue 4 meses (1-44). La probabilidad de recaída tras un trasplante alogénico fue de un $40 \pm 5\%$.

De los que 73 pacientes que recibieron un trasplante alogénico sin manipular, 28 recayeron (38,3%). La mediana de recaída de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico sin manipular fue de 3 meses (1-44). La probabilidad de recaída fue de un $45 \pm 6\%$. La localización de las recaída fue, en 15 pacientes en médula ósea aislada (65,2%); en 5 extramedular (21,7%); en 3 combinada (13,1%); y no consta la localización de la recaída en 5 pacientes.

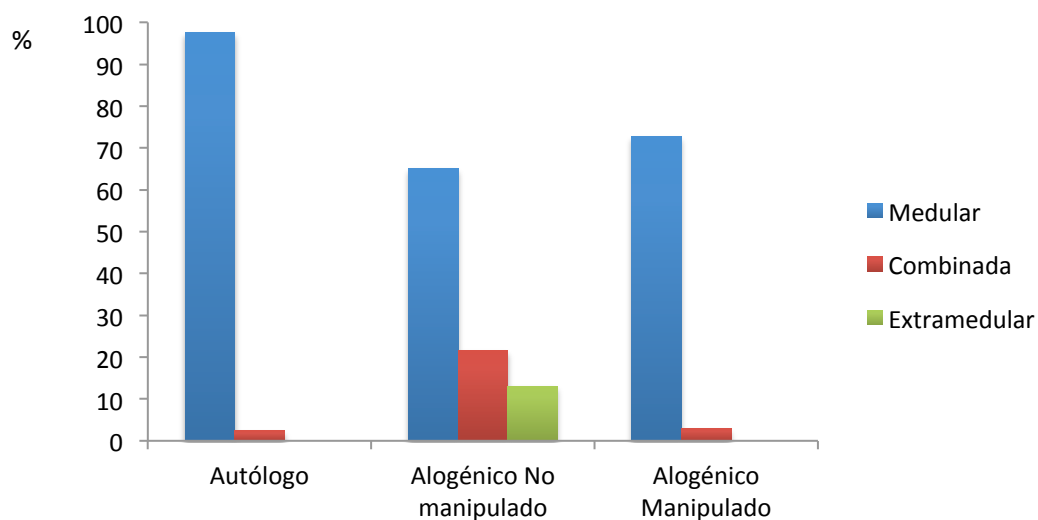
De los 42 pacientes que recibieron un trasplante alogénico con manipulación, 11 recayeron (26,2%). La mediana de recaída fue de 8 meses (1-39). La probabilidad de recaída postrasplante alogénico manipulado fue de un $31 \pm 8\%$. Tuvieron una recaída medular 8 pacientes (72,7%) y 3 una recaída combinada (27,3%).

Gráfico 1 . Descripción de la recaída en cada tipo de trasplante



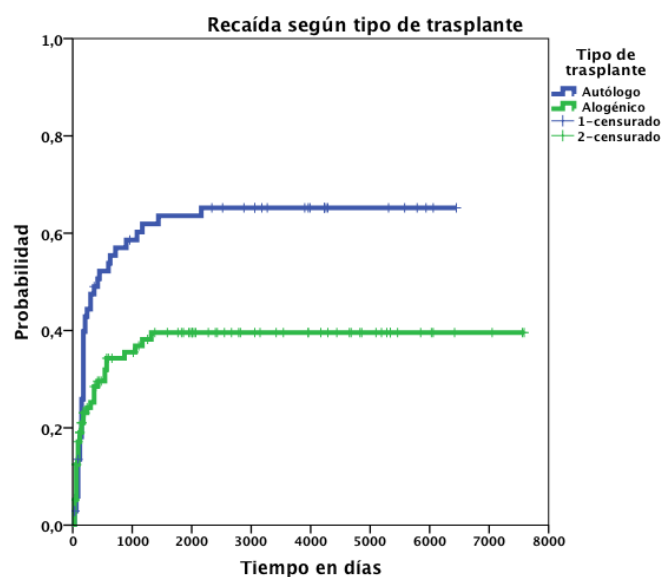
Solo se produjeron 5 recaídas extramedulares aisladas en el estudio. Todas en el grupo de trasplante alogénico sin manipular. Todos eran varones. Todos fueron trasplantados por una LLA; dos en fase precoz y 4 en fase avanzada. Ninguno presentó EICH crónica (3 de ellos no presentaron ninguna forma de EICH y 2 EICH aguda). Hay estudio de quimerismo precoz solo en 3 pacientes y los 3 tenían quimerismo precoz completo.

Gráfico 2. Localización de recaídas en los distintos tipos de trasplante



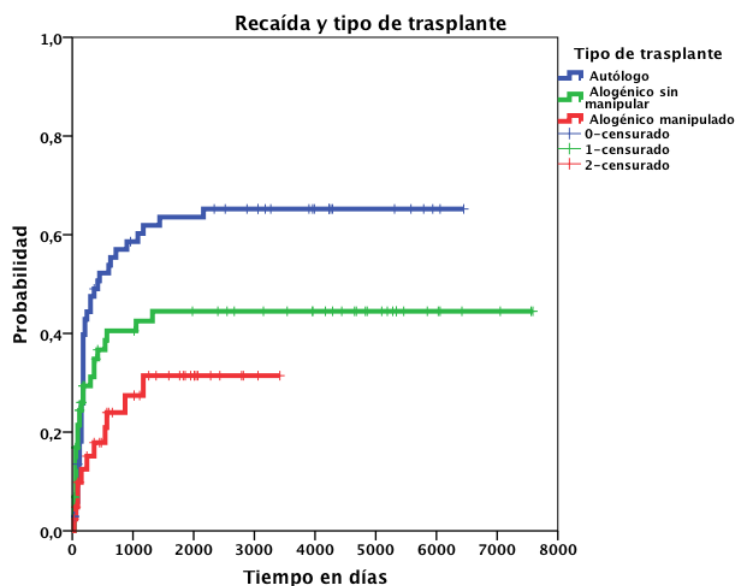
Los pacientes que recibieron un trasplante autólogo presentaron una probabilidad de recaída de un $65 \pm 6\%$ y los que recibieron un trasplante alogénico de un $40 \pm 5\%$ ($p=0,005$).

Gráfico 3. Probabilidad de recaída según trasplante autólogo o alogénico ($p=0,005$)



La probabilidad de recaída postrasplante autólogo fue de un $65 \pm 6\%$, postrasplante alogénico sin manipular de un $45 \pm 6\%$ y postrasplante alogénico manipulados de un $31 \pm 8\%$. Estas diferencias en la probabilidad de recaída fueron estadísticamente significativas entre el trasplante autólogo y el trasplante alogénico manipulado ($p=0,002$).

Gráfico 4. Probabilidad de recaída según tipo de trasplante (p global=0,006)



1.2. CINÉTICA DE RECAÍDA POSTRASPLANTE

La cinética de recaída se estudió comparando la mediana de recaída en los pacientes de los distintos tipos de trasplante. Ver gráfico 4.

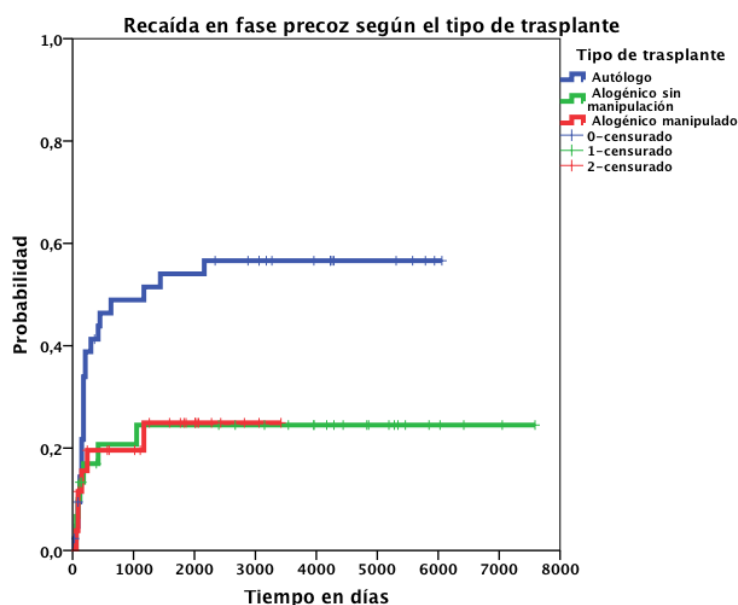
- La mediana de recaída en los pacientes que recibieron un trasplante autólogo fue de 6 meses (1-72).
- La mediana de recaída de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico sin manipular fue de 3 meses (1-44).
- La mediana de recaída de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico manipulado fue de 8 meses (1-39).

Se comparó la cinética de recaída de los pacientes que se trasplantaron, de forma global, en fase precoz y en fase avanzada separándolos según los distintos tipos de trasplantes (sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las medianas de tiempo hasta recaída).

Pacientes que se trasplantaron en fase precoz:

- La mediana de recaída en los pacientes que recibieron un trasplante autólogo en fase precoz de la enfermedad fue de 6 meses (1-72).
- La mediana de recaída en los pacientes que recibieron un trasplante alogénico sin manipular en fase precoz fue de 4 meses (2-35).
- La mediana de recaída en los pacientes que recibieron un trasplante alogénico manipulado en fase precoz fue de 4 meses (2-39).

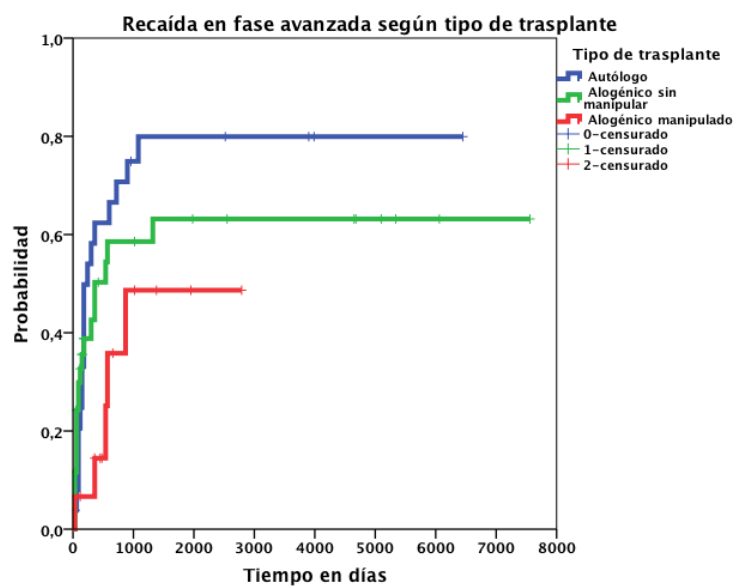
Gráfico 5. Probabilidad de recaída con enfermedad precoz según tipo de trasplante ($p=0,014$)



Pacientes que se trasplantaron en fase avanzada:

- La mediana de recaída en los pacientes que reciben un trasplante autólogo que están en fase avanzada de la enfermedad fue de 6 meses (1-36).
- La mediana de recaída en los pacientes que reciben un trasplante alogénico sin manipular en fase avanzada fue de 3 meses (1-44).
- La mediana de recaída en los pacientes que reciben un trasplante alogénico manipulado en fase avanzada fue de 18 meses (1-29). En este subgrupo de pacientes se produjeron pocos eventos (solo 5 recaídas).

Gráfico 6. Probabilidad de recaída con enfermedad avanzada según tipo trasplante ($p=0,1$)



1.3. ANÁLISIS DE RECAÍDA POSTRASPLANTE AUTÓLOGO

Se realizó análisis univariado y multivariado de las variables para investigar los factores que contribuyeron en la recaída.

1.3.1. ANÁLISIS UNIVARIADO DE RECAÍDA POSTRASPLANTE AUTÓLOGO

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar las variables: edad, estirpe de enfermedad, uso de irradiación corporal total en el acondicionamiento, fuente de progenitores estudiada, celularidad CD34⁺ infundida.

No se analizaron las siguientes variables: número de trasplante, porque en todos los casos el trasplante estudiado era el primero que se le realizaba al paciente, ni el tipo de acondicionamiento, porque en todos los casos fue un acondicionamiento mieloablativo.

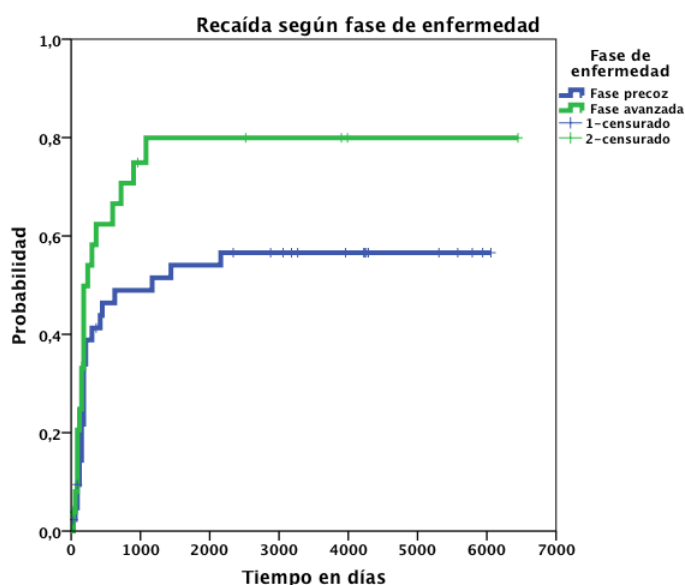
1.3.1.1. Género

La probabilidad de recaída para los varones fue de $71 \pm 6\%$, y en las niñas de $46 \pm 13\%$ ($p=0,1$).

1.3.1.2. Fase de enfermedad al trasplante

La probabilidad de recaída para la fase temprana fue de un $57 \pm 8\%$, y de un $80 \pm 8\%$ en fase tardía ($p=0,046$).

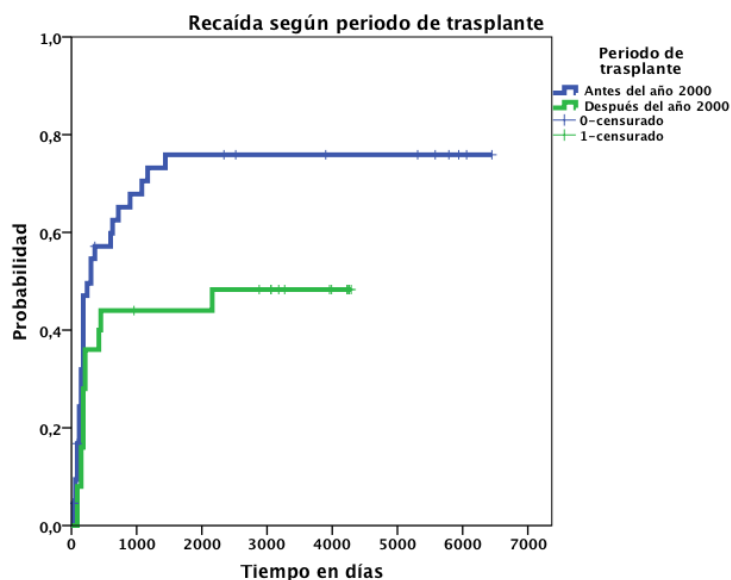
Gráfico 7. Probabilidad de recaída en trasplante autólogo según fase de enfermedad ($p=0,046$)



1.3.1.3. Periodo de realización del trasplante

La probabilidad de recaída tras la realización de un trasplante autólogo, si se realizó antes del año 2000, fue de un $75 \pm 7\%$ y si se realizó desde el 2000 de un $48 \pm 10\%$ ($p=0,03$).

Gráfico 8. Probabilidad de recaída en trasplante autólogo según periodo ($p=0,03$)



1.3.2. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE RECAÍDA POSTRASPLANTE AUTÓLOGO

Se incluyeron en la ecuación las variables género, fase de enfermedad y periodo de realización del trasplante.

Tabla 21. Análisis Multivariado de recaída en pacientes que han recibido un TPH autólogo

Variable	HR	IC 95%	p
Periodo de realización del trasplante	2,029	1,036 - 3,973	0,039

HR: *Hazard Ratio* en inglés; razón de tasas de incidencia del evento recaída; IC: Intervalo de confianza

Los pacientes que recibieron un trasplante autólogo antes del 2000 presentaron una probabilidad de recaída del doble que los que lo recibieron después del 2000.

1.4. ANÁLISIS DE RECAÍDA POSTRASPLANTE ALOGÉNICO

Se realizó análisis univariado y multivariado de las variables para establecer factores que contribuyeron en la recaída.

1.4.1. ANÁLISIS UNIVARIADO DE RECAÍDA POSTRASPLANTE ALOGÉNICO

1.4.1.1. Edad

Los lactantes (menores de 2 años) tuvieron una probabilidad de recaída de un $57 \pm 14\%$ frente al resto de pacientes de más edad que tuvieron un $37 \pm 5\%$ ($p = 0,09$).

1.4.1.2. Género

La probabilidad de recaída para los varones fue de $48 \pm 7\%$ frente al $28 \pm 7\%$ que mostraron las niñas ($p=0,095$).

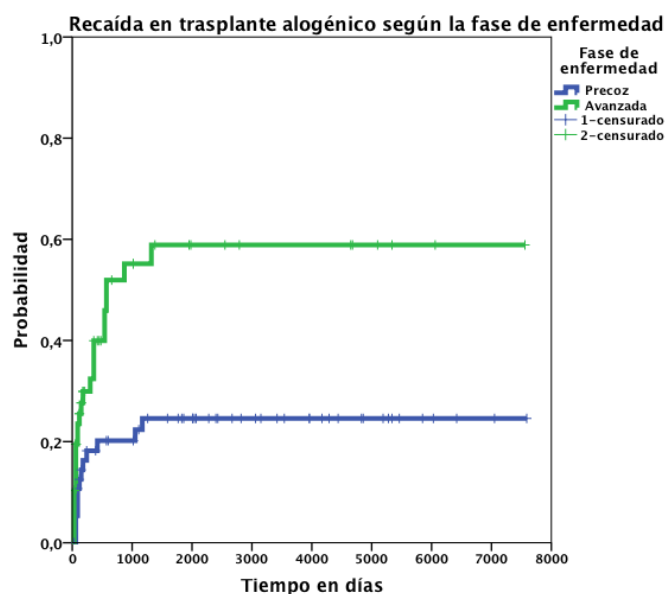
1.4.1.3. Estirpe de la enfermedad de base

La probabilidad de recaída en pacientes con leucemias linfoblásticas fue de un $44 \pm 7\%$ y en las de patología mieloide fue de un $32 \pm 8\%$ ($p=0,37$).

1.4.1.4. Fase de enfermedad al trasplante

La probabilidad de recaída para la fase temprana fue de un $25 \pm 6\%$ frente a la de fase tardía con un $59 \pm 8\%$ ($p=0,001$).

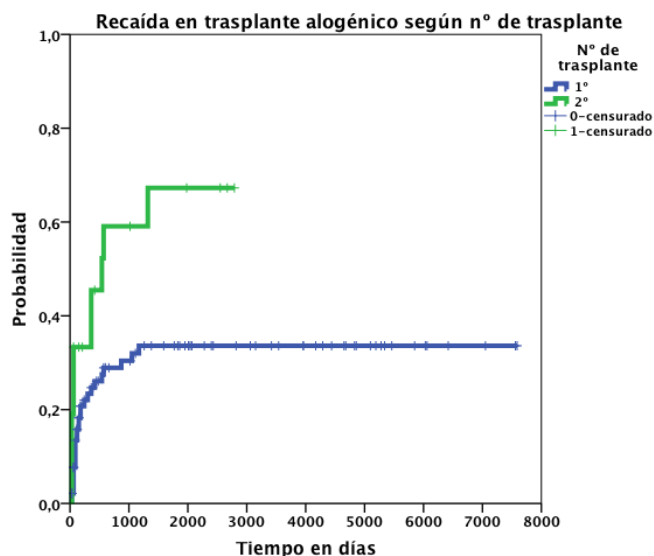
Gráfico 9. Probabilidad de recaída en trasplante alogénico según fase de enfermedad ($p=0,001$)



1.4.1.5. Número de trasplante

La recaída fue mayor en los pacientes que ya habían recibido un trasplante previo $67 \pm 12\%$ frente a un $34 \pm 5\%$ de recaída si se trataba del primer trasplante ($p=0,005$).

Gráfico 10. Probabilidad de recaída en trasplante alogénico según N° de trasplante ($p=0,005$)



1.4.1.6. Periodo de realización del trasplante

La probabilidad de recaída tras la realización de un trasplante alogénico fue similar si se realizó antes o después del año 2000, $46 \pm 9\%$ y $46 \pm 6\%$ respectivamente ($p=0,36$).

1.4.1.7. Acondicionamiento

La probabilidad de recaída en los pacientes que recibieron un acondicionamiento mieloablativo fue de un $39 \pm 6\%$ y de un $40 \pm 8\%$ con uno de intensidad reducida ($p=0,95$).

1.4.1.8. Uso de irradiación corporal total

La probabilidad de recaída en los pacientes que sí recibieron radioterapia como parte del acondicionamiento fue de $37 \pm 10\%$ frente a los que no con un $41 \pm 6\%$ ($p=0,7$).

1.4.1.9. Fuente de progenitores

La probabilidad de recaída en los pacientes que recibieron un trasplante de médula ósea fue de un $58 \pm 14\%$; la de los que recibieron un trasplante de progenitores extraídos de sangre periférica, de un $37 \pm 5\%$; y la de los que recibieron un trasplante de sangre de cordón umbilical de un $50 \pm 25\%$ ($p=0,13$ entre médula y sangre periférica; $p=0,87$ entre médula y cordón; $p=0,47$ entre sangre periférica y sangre de cordón).

1.4.1.10. Celularidad infundida de progenitores hematopoyéticos

La mediana de células progenitoras (CD34⁺) infundidas en los pacientes que recibieron un trasplante fue de $5,5 \times 10^6$ /Kg (1×10^5 - 39×10^6).

La probabilidad de recaída en los pacientes que recibieron menos de $5,5 \times 10^6$ CD34⁺/Kg fue de $35 \pm 8\%$ y la de los que recibieron más de $5,5 \times 10^6$ CD34⁺/Kg de $42 \pm 8\%$ ($p=0,32$).

1.4.1.11. Celularidad linfocitos T infundida en el momento del trasplante

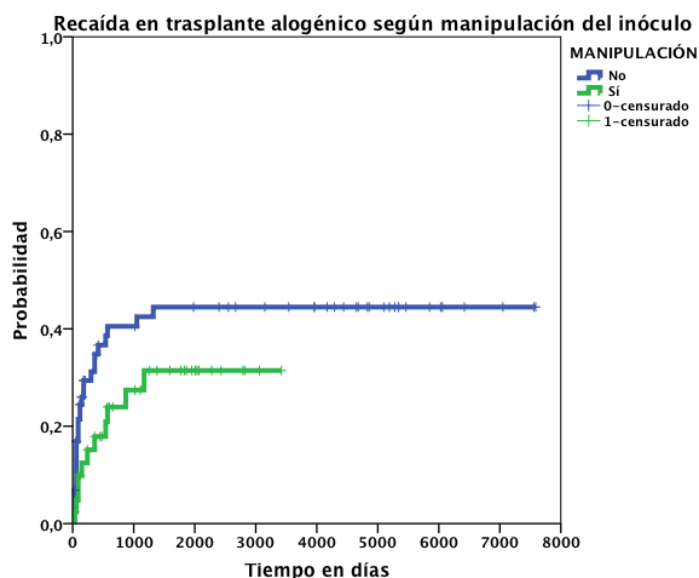
La mediana de linfocitos T infundidos en el momento del trasplante en los pacientes que recibieron un trasplante alogénico fue de 3×10^5 /Kg (1×10^3 - 13800×10^5).

Los pacientes que recibieron menos de la mediana de linfocitos T tuvieron una probabilidad de recaída de un $28 \pm 8\%$, y los que recibieron por encima de la mediana un $35 \pm 10\%$ ($p=0,36$).

1.4.1.12. Manipulación

Los pacientes que recibieron un trasplante sin manipulación del inóculo tuvieron una probabilidad de recaída de un $45 \pm 6\%$ frente a los que recibieron un trasplante con selección CD34⁺ cuya probabilidad de recaída fue de un $31 \pm 8\%$ ($p=0,1$).

Gráfico 11. Probabilidad de recaída en trasplante alogénico según manipulación ($p=0,1$)



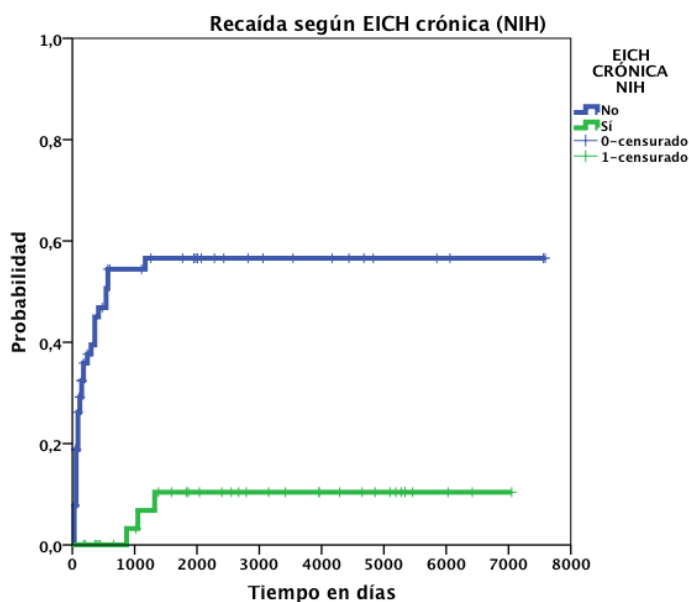
1.4.1.13. Enfermedad de Injerto Contra Huésped Aguda

La probabilidad de recaída en pacientes sin EICH aguda fue de $36 \pm 6\%$ y con presencia de EICH aguda de $57 \pm 13\%$ ($p=0,2$).

1.4.1.14. Enfermedad de Injerto Contra Huésped Crónica

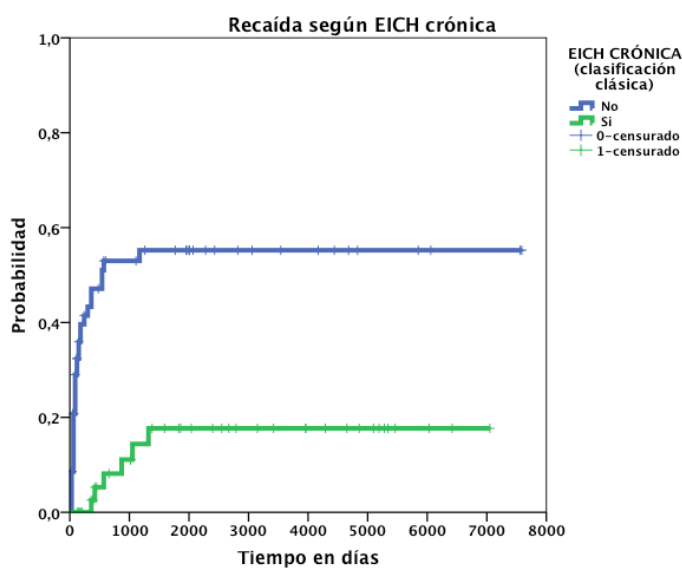
Basándose en la clasificación de la EICH del NIH, la probabilidad de recaída en los pacientes que no presentaron EICH crónica fue significativamente mayor, $57 \pm 6\%$ comparada con aquellos pacientes que tuvieron EICH crónica, que fue $10 \pm 6\%$ ($p=0,0001$).

Gráfico 12. Probabilidad de recaída en trasplante alogénico según EICH crónica NIH ($p=0,0001$)



La probabilidad de recaída en los pacientes que presentaron EICH crónica según la clasificación clásica fue de un $55 \pm 7\%$ sin EICH crónica y de un $18 \pm 7\%$ con EICH crónica ($p=0,0001$).

Gráfico 13. Probabilidad de recaída en trasplante alogénico según EICH crónica según clasificación clásica ($p=0,0001$)



1.4.1.15. Quimerismo completo precoz

La probabilidad de recaída en los pacientes que no consiguieron alcanzar un quimerismo completo precoz fue de un $39 \pm 10\%$ y de un $39 \pm 7\%$ si presentaron un quimerismo completo en esa fecha ($p=0,78$).

1.4.1.16. Quimerismo en los distintos momentos postrasplante

Se comparó la probabilidad de recaída en función del quimerismo de los pacientes a los 3 meses, los 6 meses, al año y a los 2 años postrasplante no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los que tenían quimera completa y los que tenían quimera mixta en ninguno de los momentos estudiados.

1.4.2. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE RECAÍDA POSTRASPLANTE ALOGÉNICO

Se incluyeron en la ecuación las variables edad, género, fase de enfermedad, manipulación del inóculo y presencia de EICH crónica.

Tabla 22. Análisis Multivariado de recaída en pacientes con un trasplante alogénico

Variable	HR	IC 95%	p
Fase de Enfermedad (enfermedad precoz)	0,349	0,18 - 0,69	0,002
No presencia de EICH crónica según NIH	9,87	3,02 - 32,27	0,0001

HR: Hazard Ratio; IC: Intervalo de confianza

Tabla 23. Análisis Multivariado de recaída en pacientes con un trasplante alogénico utilizando como criterio de EICH crónica la que aparece después del día +100

Variable	HR	IC 95%	p
Fase de Enfermedad (enfermedad precoz)	0,349	0,18 - 0,69	0,01
No presencia de EICH crónica (+ 100 días)	5,9	2,46 – 14,17	0,0001

HR: Hazard Ratio; IC: Intervalo de confianza

Los pacientes que se trasplantaron en fase avanzada tuvieron casi el triple de probabilidades de recaer que los que se trasplantaron en fases más precoces.

Los pacientes que tras el trasplante desarrollaron una EICH crónica presentaron casi 10 veces menos probabilidades de recaer que los que no desarrollaron EICH crónica si se utilizó el sistema propuesto por el NIH y casi 6 veces menos si se utilizó el sistema clásico de clasificación de EICH.

1.5. ANÁLISIS DE LA RECAÍDA POSTRASPLANTE ALOGÉNICO SEGÚN EICH CRÓNICA

Como la presencia de EICH crónica impacta en la probabilidad de recaída, tiene sentido realizar un estudio para comprobar si distintas variables influyen en la probabilidad de recaída en función de si los pacientes presentaron o no EICH crónica, mediante la clasificación del NIH modificada.

Tabla 24. Análisis de probabilidad de recaída en TPH alogénico según las variables en función de presencia o no de EICH crónica

Variable	Opciones variable	Presencia EICH crónica	Probabilidad de recaída %	Significación estadística
Edad	Lactante	Sin EICH Con EICH	68 ± 5 0	0,15
	Resto de edad	Sin EICH Con EICH	55 ± 7 11 ± 6	0,0001
Género	Varón	Sin EICH Con EICH	67 ± 8 15 ± 10	0,0001
	Mujer	Sin EICH Con EICH	41 ± 10 7 ± 6	0,014
Estirpe	Linfoide	Sin EICH Con EICH	63 ± 8 12 ± 8	0,0001
	Mieloide	Sin EICH Con EICH	47 ± 10 8 ± 8	0,001
Fase de enfermedad	Precoz	Sin EICH Con EICH	38 ± 9 5 ± 5	0,005
	Avanzada	Sin EICH Con EICH	78 ± 9 23 ± 14	0,0001
Acondicionamiento	Mieloablativo	Sin EICH Con EICH	58 ± 9 10 ± 7	0,0001
	Intensidad Reducida	Sin EICH Con EICH	55 ± 10 9 ± 9	0,006
Manipulación	No	Sin EICH Con EICH	67 ± 8 10 ± 7	0,0001
	Sí	Sin EICH Con EICH	42 ± 10 10 ± 9	0,046
Quimerismo completo precoz	No	Sin EICH Con EICH	52 ± 12 0	0,046
	Sí	Sin EICH Con EICH	59 ± 10 16 ± 9	0,0001
Celularidad CD34⁺	Menos de la mediana	Sin EICH Con EICH	49 ± 11 17 ± 11	0,009
	Más de la mediana	Sin EICH Con EICH	64 ± 10 7 ± 7	0,0001
Celularidad linfocitos T	Menos de la mediana	Sin EICH Con EICH	41 ± 11 0	0,02
	Más de la mediana	Sin EICH Con EICH	71 ± 16 9 ± 9	0,001

Para estudiar la potencia del EICL asociado al EICH estudiamos al revés las variables para valorar la recaída en los pacientes que presentaron o no EICH, para comprobar si en algún subgrupo tener o no EICH lleva asociada una disminución de las recaídas.

Tabla 25. Análisis de probabilidad de recaída en TPH alogénico en función de presencia o no de EICH crónica en las distintas variables.

Variable	Opciones variable	Presencia EICH crónica	Probabilidad de recaída %	Significación estadística
Edad	Sin EICH	Lactante Resto	68 ± 5 55 ± 7	0,24
	Con EICH	Lactante Resto	0 11 ± 6	0,63
Género	Sin EICH	Varón Mujer	67 ± 8 41 ± 10	0,11
	Con EICH	Varón Mujer	15 ± 10 7 ± 6	0,5
Estirpe	Sin EICH	Linfoide Mieloide	63 ± 8 47 ± 10	0,44
	Con EICH	Linfoide Mieloide	12 ± 8 8 ± 8	0,74
Fase de enfermedad	Sin EICH	Precoz Avanzada	38 ± 9 78 ± 9	0,04
	Con EICH	Precoz Avanzada	5 ± 5 23 ± 14	0,14
Acondicionamiento	Sin EICH	Mieloablatoivo Intensidad Reducida	58 ± 9 55 ± 10	0,46
	Con EICH	Mieloablatoivo Intensidad Reducida	10 ± 7 9 ± 9	0,88
Manipulación	Sin EICH	No manipulados Manipulados	67 ± 8 42 ± 10	0,01
	Con EICH	No manipulados Manipulados	10 ± 7 10 ± 9	0,85
Quimerismo completo precoz	Sin EICH	No Sí	52 ± 12 59 ± 10	0,72
	Con EICH	No Sí	0 16 ± 9	0,35
Celularidad CD34	Sin EICH	< mediana > mediana	49 ± 11 64 ± 10	0,21
	Con EICH	< mediana > mediana	17 ± 11 7 ± 7	0,42
Celularidad linfocitos T	Sin EICH	< mediana > mediana	41 ± 11 71 ± 16	0,03
	Con EICH	< mediana > mediana	0 9 ± 9	0,36

2. ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED AGUDA

2.1. DESCRIPCIÓN DE LA EICH AGUDA

34 de los 115 pacientes que recibieron un trasplante alogénico presentaron alguna forma de EICH aguda (29,6%). La probabilidad de desarrollar EICH aguda en los pacientes que recibieron un trasplante alogénico fue de un $40 \pm 8\%$, (incluyendo las formas *overlap*). Si se considera como EICH aguda la que aparece antes del día +100, la probabilidad fue de un $47 \pm 5\%$. La probabilidad de desarrollar un EICH aguda grave fue de un $19 \pm 4\%$.

De los 73 pacientes que recibieron un trasplante alogénico sin manipulación del inóculo, 28 presentaron EICH aguda (38,4%). Presentaron formas graves de EICH aguda (grados III-IV) 15 pacientes (20,5%). La mediana de aparición de EICH aguda fue de 20 días (7 días–155 meses). La probabilidad de EICH aguda fue $48 \pm 8\%$. La probabilidad de EICH aguda grave fue $26 \pm 6\%$.

De los 42 pacientes que recibieron un trasplante alogénico manipulado, 6 presentaron EICH aguda (14,3%). Presentaron formas graves de EICH aguda (grados III-IV) solo 3 pacientes (7,1%). La mediana de aparición del EICH aguda fue 54 días (1–21 meses). La probabilidad de EICH aguda fue de $18 \pm 7\%$. La probabilidad de EICH aguda grave fue de $8 \pm 4\%$.

Gráfico 14. Porcentaje de pacientes que desarrollaron EICH aguda y EICH aguda grave según el tipo de trasplante alogénico

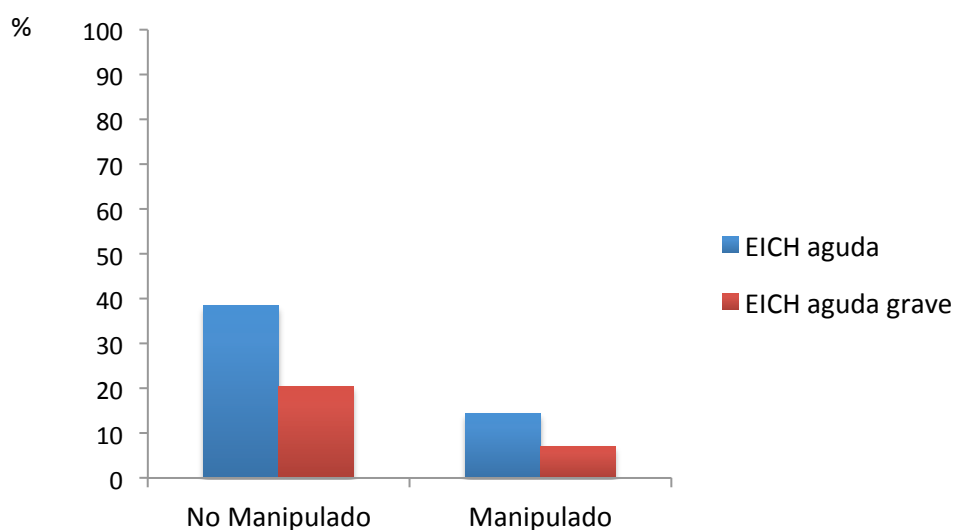
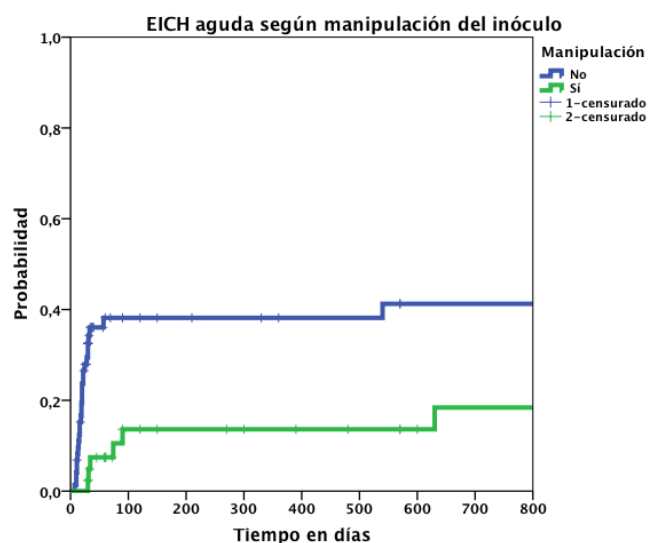
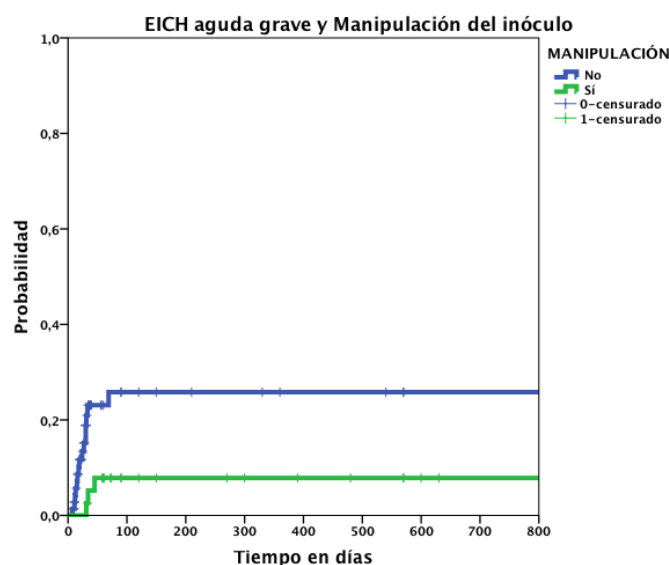


Gráfico 15: Probabilidad de EICH aguda según tipo de trasplante alogénico ($p=0,002$)Gráfico 16: Probabilidad de EICH aguda grave según tipo de trasplante alogénico ($p=0,015$)

2.2. DESCRIPCIÓN DE LA EICH AGUDA TRAS INFUSIÓN DE LINFOCITOS DEL DONANTE

De los 37 pacientes que recibieron ILD, 10 (27%) presentaron EICH aguda posterior a la infusión de linfocitos.

La mediana de tiempo desde la ILD hasta la aparición de EICH aguda fue de 13 días (2–44 días). Con respecto a la severidad de la EICH aguda, 8 pacientes (22%) presentaron formas leves de EICH aguda (I-II), y 2 pacientes (5%) formas más graves (III). Ningún paciente presentó EICH aguda grado IV y en ningún caso fue mortal.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la recaída de los pacientes en función de si presentaron o no EICH aguda tras la ILD.

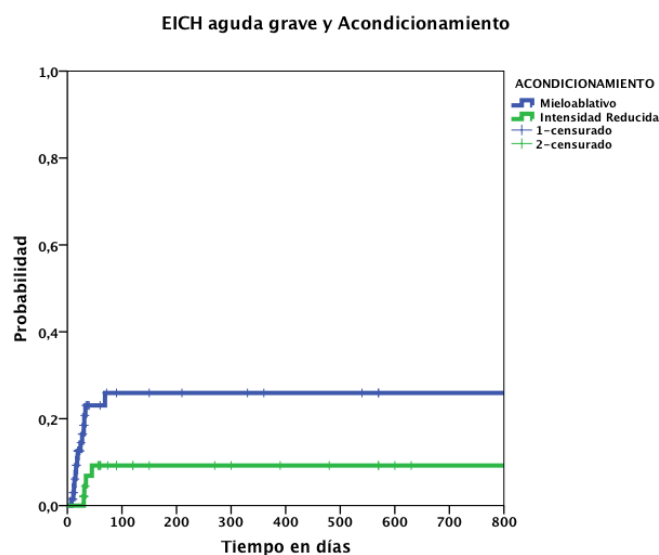
2.3. ANÁLISIS DE EICH AGUDA GRAVE

2.3.1. ANALISIS UNIVARIADO EICH AGUDA GRAVE

2.3.1.1. Acondicionamiento

La probabilidad de desarrollar EICH aguda grave en los que recibieron un acondicionamiento mieloablativo fue de un $26 \pm 6\%$ frente a un $9 \pm 4\%$ de los que recibieron un acondicionamiento de intensidad reducida ($p=0,02$).

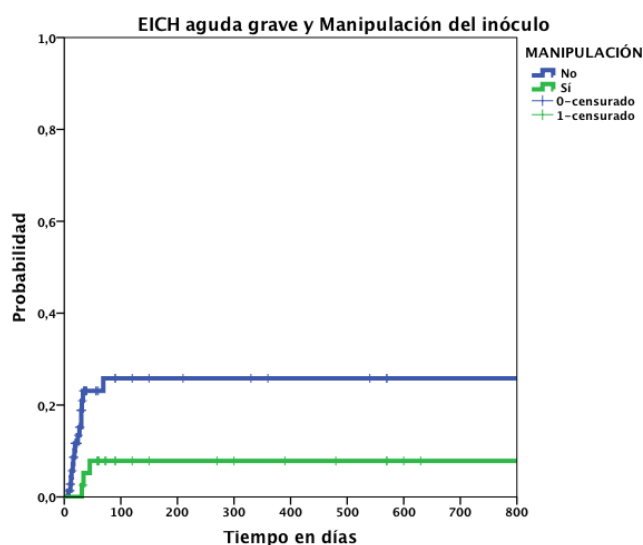
Gráfico 17. Probabilidad de EICH aguda grave según acondicionamiento ($p=0,02$)



2.3.1.2. Manipulación

Los pacientes que recibieron un trasplante sin manipular presentaron una probabilidad de EICH aguda grave de un $26 \pm 6\%$, frente a un $8 \pm 4\%$ de los que recibieron un trasplante con manipulación del inóculo ($p=0,015$).

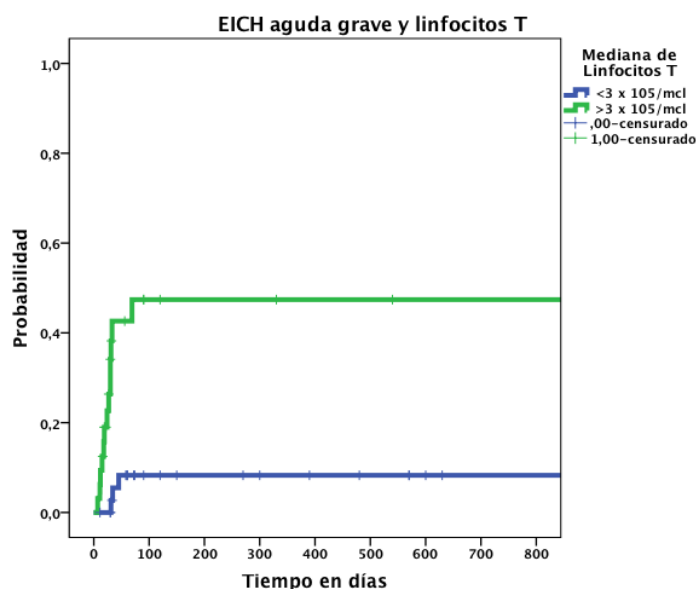
Gráfico 18. Probabilidad de EICH aguda grave según tipo de manipulación ($p=0,015$)



2.3.1.3. Celularidad CD3⁺ infundida en el inóculo

La mediana de los linfocitos T infundidos en el momento del trasplante en los trasplantes alogénicos fue de 3×10^5 /Kg. El número de linfocitos T en el momento de la infusión sí resultó determinante para la probabilidad de desarrollar una EICH aguda grave ($p=0,0001$). Los pacientes que recibieron por encima de la mediana de linfocitos T presentaron una probabilidad de desarrollar EICH agudo grave de un $47 \pm 10\%$ frente a $8 \pm 5\%$ de aquellos que recibieron menos de 3×10^5 /Kg.

Gráfico 19. Probabilidad de EICH aguda grave según el N° linfocitos T en el inóculo ($p=0,0001$)



A continuación, en la tabla 26, se resumen otras variables que aunque no son estadísticamente significativas sí entrarán en el análisis multivariado de la probabilidad de EICH aguda grave. El resto de variables no aparecen ya que no resultaron relevantes en el análisis.

Tabla 26. Análisis univariado de probabilidad de EICH aguda grave en trasplante alogénico. Resumen de Variables que rozan significación estadística.

Variable	Opciones de la Variable	Probabilidad de EICH aguda	Significación estadística
Edad	Niños	$18 \pm 4\%$	0,092
	Adolescentes (>12 años)	$30 \pm 10\%$	
Fase de Enfermedad	Precoz	$12 \pm 5\%$	0,061
	Avanzada	$26 \pm 6\%$	
Número de Trasplante	Primero	$15 \pm 4\%$	0,066
	Segundo	$36 \pm 13\%$	
Fuente de Progenitores	Sangre periférica	$22 \pm 5\%$	0,069
	Otra (médula ósea o cordón)	0	
Quimerismo completo precoz	No	$9 \pm 6\%$	0,1
	Sí	$26 \pm 6\%$	

2.3.2. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE EICH AGUDA GRAVE

Se introdujeron las variables edad, fase de enfermedad, número de trasplante, tipo de acondicionamiento utilizado, fuente de progenitores, manipulación del inóculo, celularidad de linfocitos T en el inóculo y quimerismo precoz.

Tabla 27. Análisis Multivariado EICH aguda grave en trasplante alogénico

Variable	HR	IC 95%	P
Acondicionamiento Mieloablatoivo	7,17	2,23 – 23,05	0,001

HR: *Hazard Ratio*; IC: Intervalo de confianza

En el análisis multivariado, la única variable que permanece es el acondicionamiento. El acondicionamiento mieloablatoivo conllevó una probabilidad de desarrollo de EICH aguda grave 7 veces mayor que un acondicionamiento de intensidad reducida.

3. ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED CRÓNICA

3.1. DESCRIPCIÓN DE LA EICH CRÓNICA

38 de los 115 trasplantes alogénicos realizados desarrollaron EICH crónica (33%).

Como este es un estudio retrospectivo, en algunos pacientes ha sido difícil establecer la clasificación de gravedad de la NIH para la EICH crónica (ya que esta clasificación da mucha importancia al grado de limitación funcional por aparatos). Por lo que se ha utilizado la clasificación de Seattle. La probabilidad de desarrollar una EICH crónica (incluyendo las formas de EICH crónica clásica y las *overlap*) fue de un $49 \pm 6\%$. Si se considera EICH crónica aquella que aparece a los 100 días postrasplante fue de un $53 \pm 6\%$. La probabilidad de desarrollar un EICH crónica extensa fue de un $42 \pm 5\%$.

En el grupo de no manipulados, 25 pacientes de los 73 presentaron EICH crónica (34,2%). Todos los pacientes con trasplante alogénico sin manipular presentaron formas extensas de EICH crónica. La mediana de tiempo para el desarrollo de la EICH crónica fue de 5 meses (2–12 meses). La probabilidad de EICH crónica fue $55 \pm 8\%$. La probabilidad de EICH crónica extensa fue $53 \pm 7\%$.

De los 42 pacientes que recibieron un trasplante alogénico manipulado, 13 presentaron EICH crónica (31%). Solo 3 pacientes de los 13 con EICH crónica presentaron una forma limitada. La mediana de tiempo para el desarrollo de la EICH crónica fue 4 meses (3–20 meses). La probabilidad de EICH crónica fue $40 \pm 9\%$. La probabilidad de EICH crónica extensa fue $28 \pm 8\%$.

Gráfico 20. Porcentaje de pacientes con EICH crónica en los tipos de trasplante alogénico

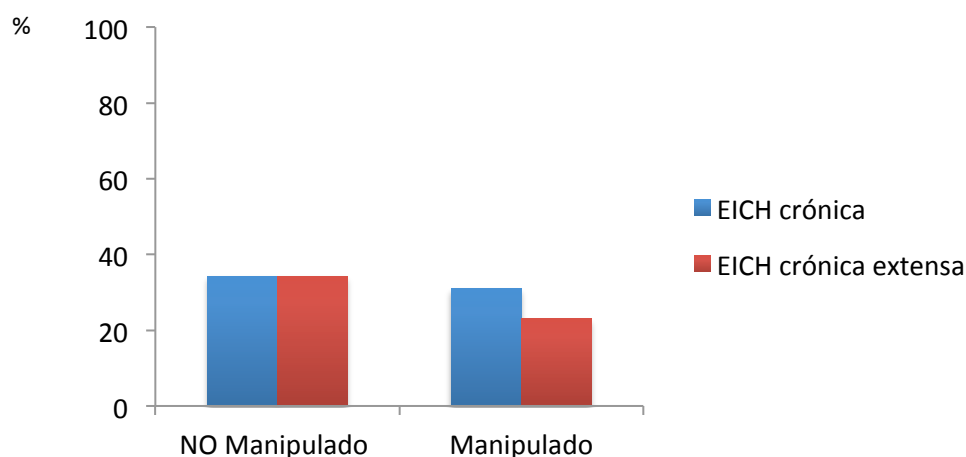
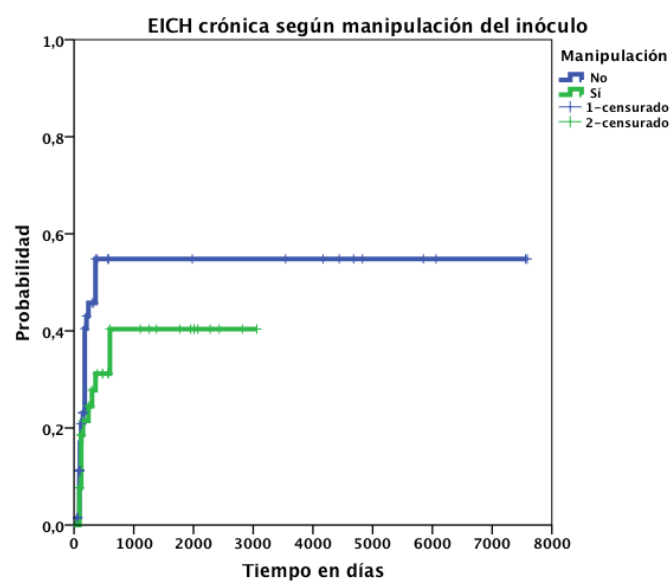
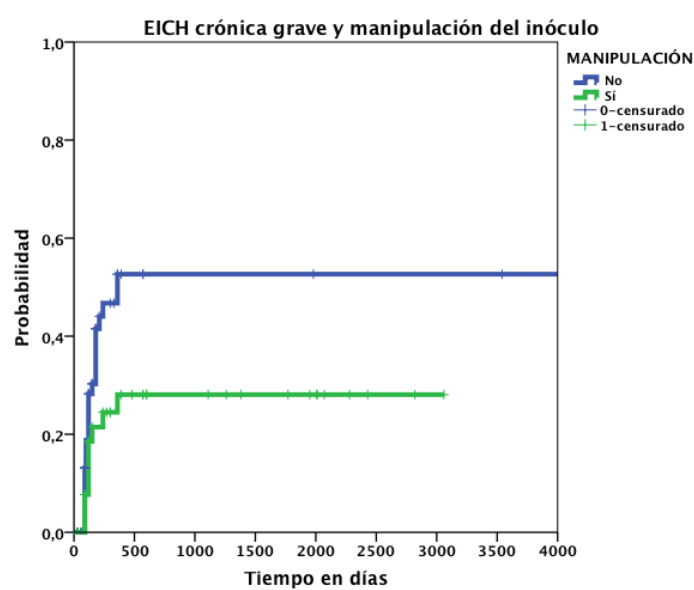


Gráfico 21. Probabilidad de EICH crónica según el tipo de trasplante ($p=0,1$)Gráfico 22. Probabilidad de EICH crónica extensa según el tipo de trasplante ($p=0,037$)

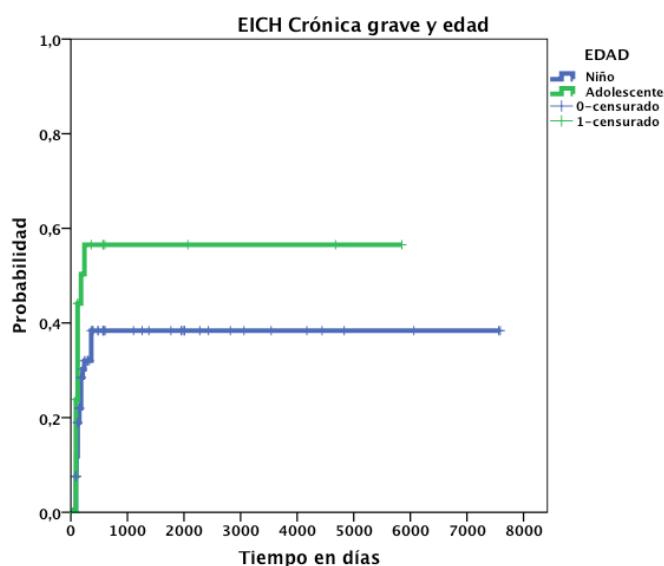
3.2. ANÁLISIS DE EICH CRÓNICA EXTENSA

3.2.1. ANÁLISIS UNIVARIADO DE EICH CRÓNICA EXTENSA

3.2.1.1. Edad

La probabilidad de desarrollar una EICH crónica extensa en los niños fue de $38 \pm 6\%$ frente un $57 \pm 12\%$ de los adolescentes ($p=0,05$).

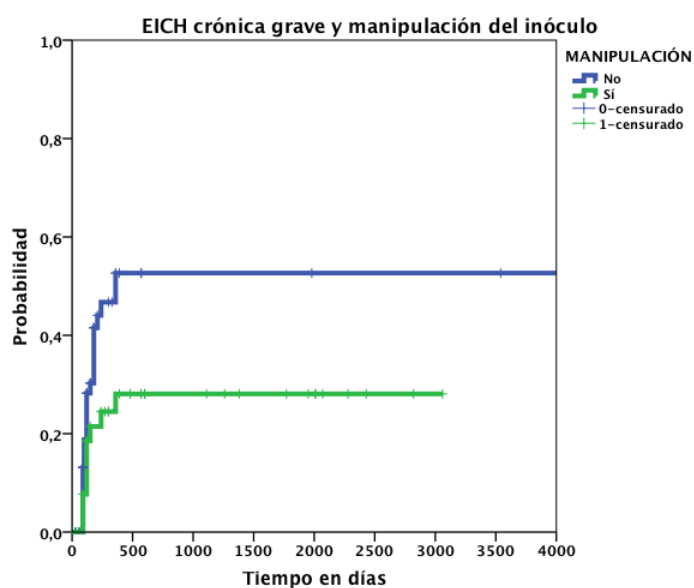
Gráfico 23. Probabilidad de EICH crónica extensa según edad ($p=0,05$)



3.2.1.2. Manipulación

Los pacientes que recibieron un trasplante sin manipular tuvieron una probabilidad de EICH crónica extensa de un $53 \pm 7\%$, frente a un $28 \pm 8\%$ de los que recibieron un trasplante con técnicas de eliminación de linfocitos T ($p=0,037$).

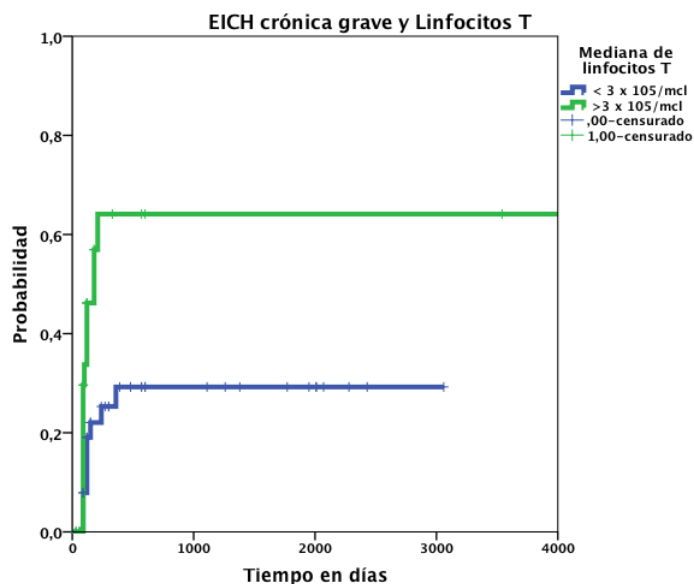
Gráfico 24. Probabilidad de EICH crónica extensa según la manipulación ($p=0,037$)



3.2.1.3. Celularidad CD3⁺ infundida en el inóculo

Los pacientes que recibieron linfocitos T por encima de la mediana, de presentaron una probabilidad de desarrollar EICH crónica extensa de $64 \pm 11\%$, frente a un $29 \pm 8\%$ de aquellos que recibieron por debajo de $3 \times 10^5/\text{Kg}$ ($p=0,04$).

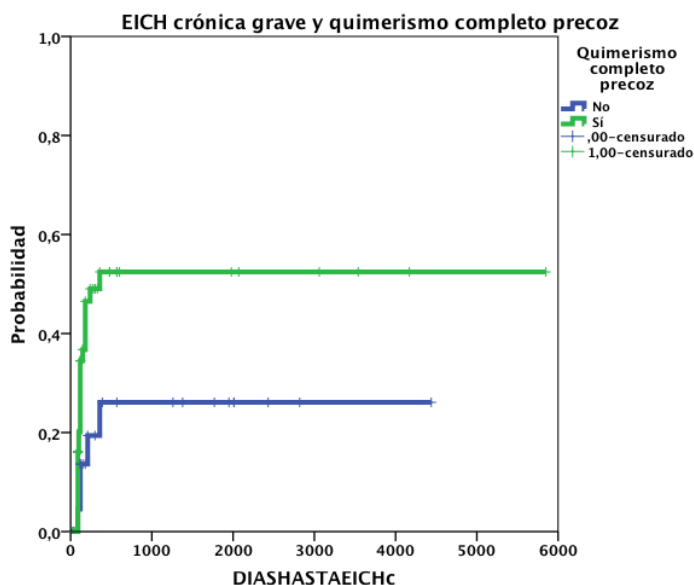
Gráfico 25. Probabilidad de EICH crónica extensa según N° de linfocitos T del inóculo ($p=0,04$)



3.2.1.4. Quimerismo completo precoz

Los pacientes que en el periodo postrasplante precoz adquirieron un quimerismo completo presentaron una probabilidad de desarrollar una EICH crónica extensa de un $52 \pm 8\%$, frente a un $26 \pm 10\%$ de los que en ese momento presentaron un quimerismo mixto. ($p=0,034$).

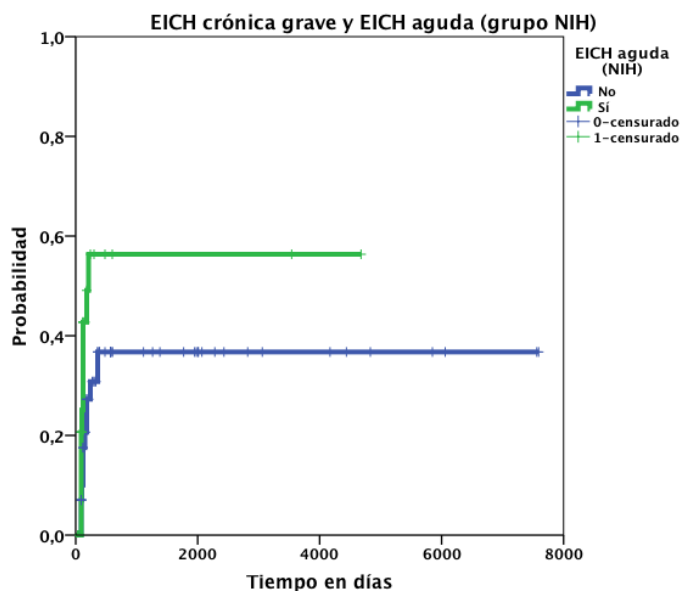
Gráfico 26. Probabilidad de EICH crónica extensa según quimerismo completo precoz ($p=0,034$)



3.2.1.5. Antecedente de presentar EICH aguda

La probabilidad de presentar una EICH crónica extensa, si se presentó EICH aguda previamente, fue de un $66 \pm 8\%$; y de un $24 \pm 6\%$ en los que no presentaron EICH aguda ($p=0,0001$).

Gráfico 27. Probabilidad de EICH crónica extensa según EICH aguda ($p=0,0001$)



3.2.2. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE EICH CRÓNICA EXTENSA

Se introdujeron las variables edad, manipulación, celularidad de linfocitos T en el inóculo, quimerismo precoz y antecedente de EICH aguda.

El único factor que permanece en la ecuación del análisis multivariado es el antecedente de EICH aguda.

Tabla 28. Análisis Multivariado EICH crónica extensa en trasplante alogénico

Variable	HR	IC 95%	p
Antecedente de EICH aguda	3,63	1,46 – 9,03	0,006

HR: Hazard Ratio; IC: Intervalo de confianza

Los pacientes que presentaron una EICH aguda tuvieron entre tres y cuatro veces más riesgo de desarrollar una EICH crónica extensa que aquellos pacientes que no desarrollaron EICH aguda.

4. ESTUDIO DE MORTALIDAD

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MORTALIDAD

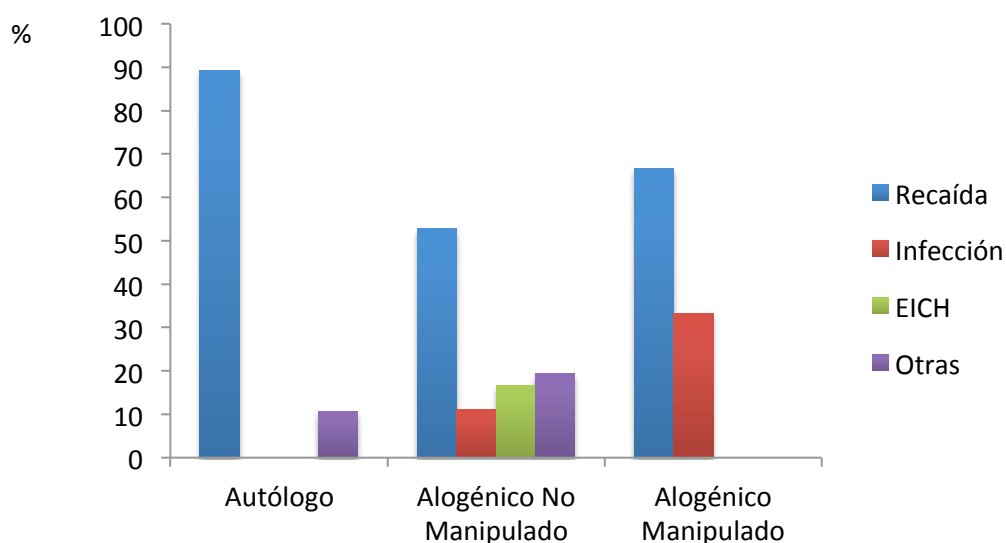
En el estudio 70 pacientes de 184 que recibieron un trasplante fallecieron (38%). De ellos, 48 fallecieron por enfermedad (68,6%), 6 por infección (8,6%), 6 por enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y 10 (14,3%) por otra causa.

De los 69 pacientes que recibieron un trasplante autólogo, 28 fallecieron (40,6%). La recaída fue la causa del exitus en 25 paciente (89,3%), y tres pacientes fallecieron por toxicidad (2 por enfermedad venoclusiva y 1 por toxicidad cardíaca).

Fallecieron 36 pacientes de los 73 que recibieron un trasplante alogénico sin manipular (49,3%). La causa de exitus fue, progresión de la enfermedad en 19 pacientes (52,8%), infección en 4 (11,1%), EICH en 6 (16,7%) y otras causas en 7 (19,4%). Dentro de las otras causas en 3 pacientes fue la microangiopatía trombótica postrasplante la responsable del exitus; un paciente falleció por un fallo multiorgánico y otro por una hemorragia pulmonar.

En el grupo de 42 pacientes que recibieron un trasplante alogénico manipulado se produjeron 6 fallecimientos (14,3%). 4 pacientes (66,7%) por recaída y 2 por infección.

Gráfico 28: Porcentaje de causas de mortalidad en los distintos tipos de trasplantes



EICH: enfermedad de injerto contra huésped

5. ESTUDIO DE LA MORTALIDAD RELACIONADA CON EL TRASPLANTE (MRT)

5.1. DESCRIPCIÓN DE LA MRT

De los 70 pacientes que fallecieron en el estudio, 22 lo hicieron por causas relacionadas con el procedimiento (31,4%). La probabilidad de Mortalidad Relacionada con el Trasplante global de todos los trasplantes, independientemente del tipo fue de $13,8 \pm 3\%$.

De los 69 pacientes que recibieron un trasplante autólogo, 3 presentaron MRT (4,3%). 2 de ellos fallecieron en el primer mes postrasplante (por enfermedad venoclusiva) y el otro, al año (por toxicidad cardíaca). La probabilidad de MRT fue de un $5 \pm 3\%$.

En el grupo de trasplante alogénico no manipulado fallecieron por MRT 17 pacientes (23,3%). La mediana de MRT fue de 5 meses (1–14 meses). La probabilidad de MRT en este subgrupo de pacientes fue de $28 \pm 6\%$.

Por último, de los 42 pacientes que recibieron un trasplante manipulado 2 fallecieron por MRT (4,8%); uno de ellos era un paciente con Síndrome de Down. Si excluimos al paciente que falleció con Síndrome de Down, un único paciente de los que recibieron un trasplante alogénico manipulado presentó MRT (2,4%). Ambos pacientes fallecieron por una infección en el seno del postrasplante inmediato. Un paciente falleció al mes y el otro a los dos meses del trasplante. La probabilidad de MRT en el trasplante alogénico manipulado fue de un $5 \pm 3\%$.

Gráfico 29. Porcentaje de MRT en los distintos tipos de trasplantes

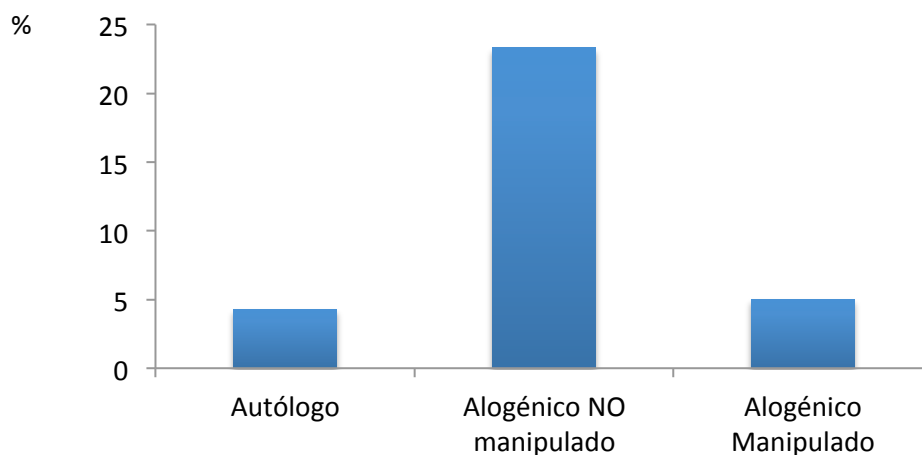
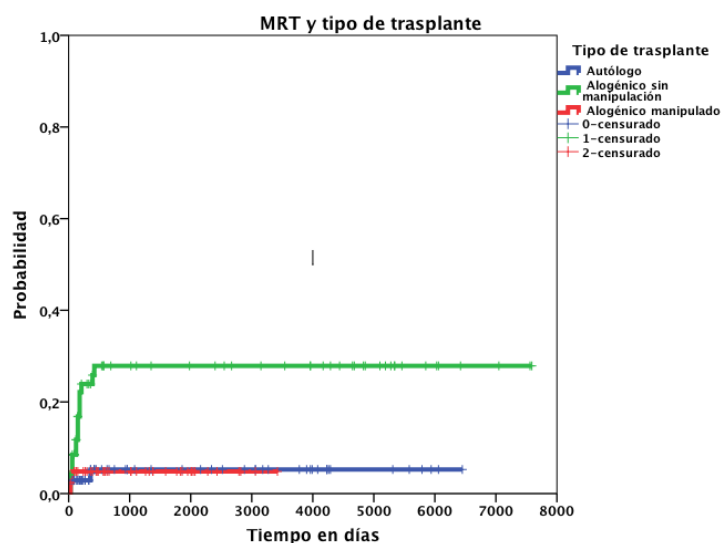


Gráfico 30. Probabilidad de MRT en los distintos tipos de trasplante. ($p=0,0001$)

Existen diferencias estadísticamente significativas en la MRT comparando el trasplante alogénico sin manipular con el autólogo ($p=0,001$) y el trasplante alogénico sin manipular y el manipulado ($p=0,008$).

Los pacientes que presentaron mayor mortalidad relacionada con el procedimiento del trasplante fueron los que recibieron un trasplante alogénico sin manipular; en los otros subgrupos la MRT es casi anecdótica.

Realizando un análisis comparativo de la probabilidad de MRT en el trasplante alogénico, se ve que existe una diferencia importante entre ambas estrategias, de un $28 \pm 6\%$ en el trasplante sin manipular frente a un $5 \pm 3\%$ en el trasplante manipulado ($p=0,008$).

Como la MRT se asoció, sobre todo, al trasplante alogénico sin manipular, se realizó el análisis univariado y multivariado de MRT en este subgrupo de pacientes.

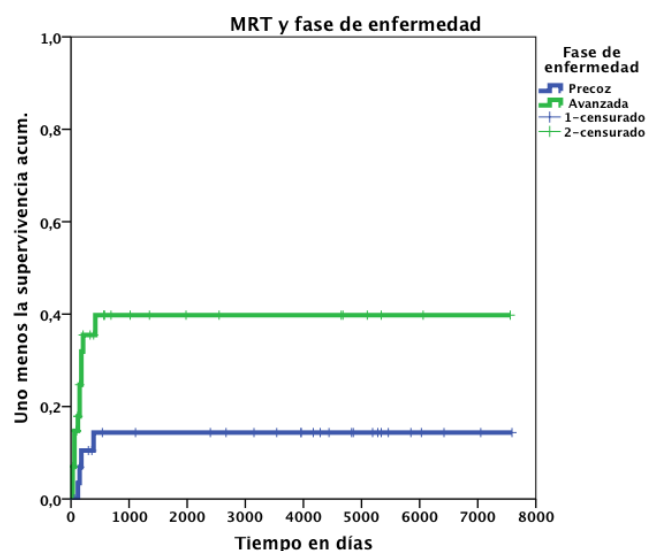
5.2. ANÁLISIS DE MRT EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO NO MANIPULADO

5.2.1. ANÁLISIS UNIVARIADO DE MRT EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO NO MANIPULADO

5.2.1.1. Fase de enfermedad

Los pacientes que se trasplantaron en fase precoz de su enfermedad tuvieron una probabilidad de MRT de un $14 \pm 7\%$, frente a un $40 \pm 9\%$ de probabilidad de MRT de los que se trasplantaron con enfermedad avanzada ($p=0,02$).

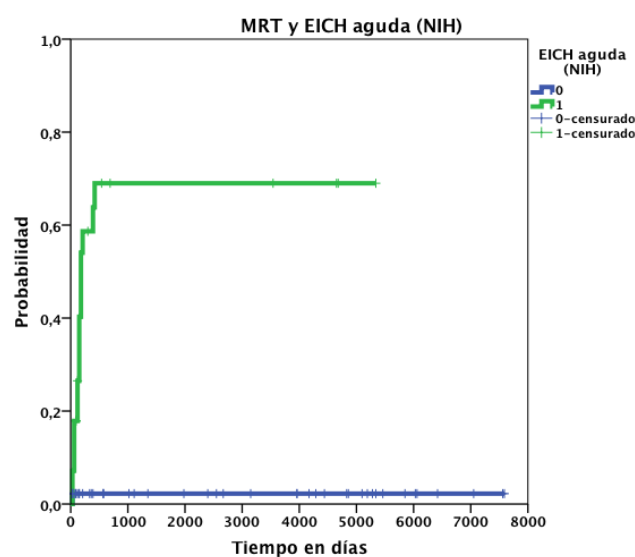
Gráfico 31. MRT según fase de enfermedad en trasplante alogénico sin manipular ($p=0,02$)



5.2.1.2. Presencia de EICH aguda

La probabilidad de MRT en los pacientes sin manifestaciones de EICH aguda fue de un $2 \pm 2\%$ y la de los pacientes con EICH aguda, independientemente de su forma de presentación y del tiempo (EICH agudo clásica, EICH aguda persistente, recurrente o de inicio tardío y formas *overlap* con manifestaciones de aguda y crónica a la vez), de un $69 \pm 10\%$ ($p=0,0001$).

Gráfico 32. MRT según EICH aguda en el trasplante alogénico sin manipular ($p=0,0001$)



A continuación, en la tabla 29 se resumen otras variables que aunque no son estadísticamente significativas en el análisis univariado pero que sí entrarán en el análisis multivariado de la probabilidad de MRT. El resto de variables no aparecen ya que no resultaron relevantes.

Tabla 29. Análisis univariado de probabilidad de MRT en trasplante alogénico no manipulado. Resumen de Variables que rozan significación estadística.

Variable	Opciones de la Variable	Probabilidad de MRT	Significación estadística
Edad	Niños	22 ± 6%	0,07
	Adolescentes (>12 años)	46 ± 13%	
Fuente de Progenitores	Sangre periférica	34 ± 7%	0,08
	Otras fuentes	6 ± 6%	
Número de CD34⁺ infundidas	< de la mediana	20 ± 8%	0,1
	> de la mediana	46 ± 11%	

5.2.2. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE MRT EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO NO MANIPULADO

Se introdujeron en la ecuación las variables edad, fase de enfermedad en el momento del trasplante, fuente de progenitores utilizada, celularidad de progenitores infundida y clasificación de EICH según NIH modificada.

Tabla 30. Análisis Multivariado de MRT en trasplante alogénico sin manipular

Variable	HR	IC 95%	p
Presencia de EICH aguda	29,59	3,85 - 227,34	0,001

HR: *Hazard Ratio*; IC: Intervalo de confianza

Como se puede observar, presentar una EICH aguda conllevó un riesgo 30 veces mayor de fallecer por toxicidad del trasplante con respecto a no manifestar EICH aguda.

La EICH aguda, como se ha visto, no lleva asociado una disminución en la recaída (no asocia EICL) y, además, sí asocia un aumento muy importante en la MRT.

6. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE EVENTOS (SLE)

6.1. DESCRIPCIÓN DE LA SLE

En 102 de los 184 trasplantes realizados durante el estudio se presentó un evento (muerte o recaída) que corresponde a un 55,4%. La probabilidad de SLE analizada de forma global en todos los pacientes del estudio, sin importar el tipo de trasplante, fue de $42 \pm 4\%$.

De los 69 pacientes que recibieron un trasplante autólogo, 45 presentaron un evento (65,2%). La mediana de aparición del evento fue de 6 meses (1–72 meses). La probabilidad de SLE fue de $33 \pm 6\%$.

De los 73 pacientes que recibieron un trasplante alogénico sin manipular, 44 presentaron un evento (60,3%). La mediana de aparición del evento fue de 4 meses (1–44). La probabilidad de SLE fue de $40 \pm 6\%$.

De los 42 pacientes que recibieron un trasplante alogénico manipulado, 13 presentaron un evento (31%). La mediana de aparición del evento fue de 5 meses (1–39). La probabilidad de SLE fue de $65 \pm 8\%$.

Gráfico 33 . Porcentaje de eventos (muerte/recaída) en los distintos tipos de trasplante

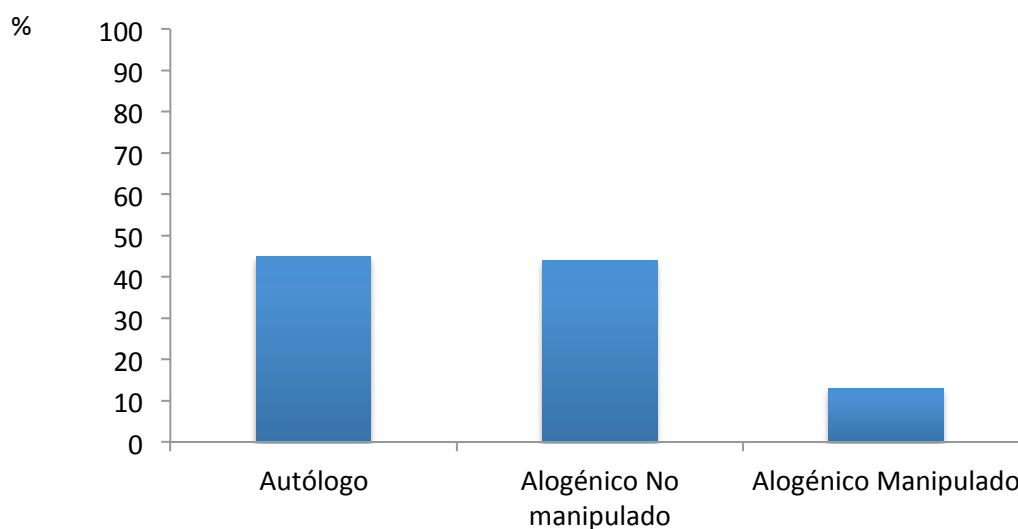
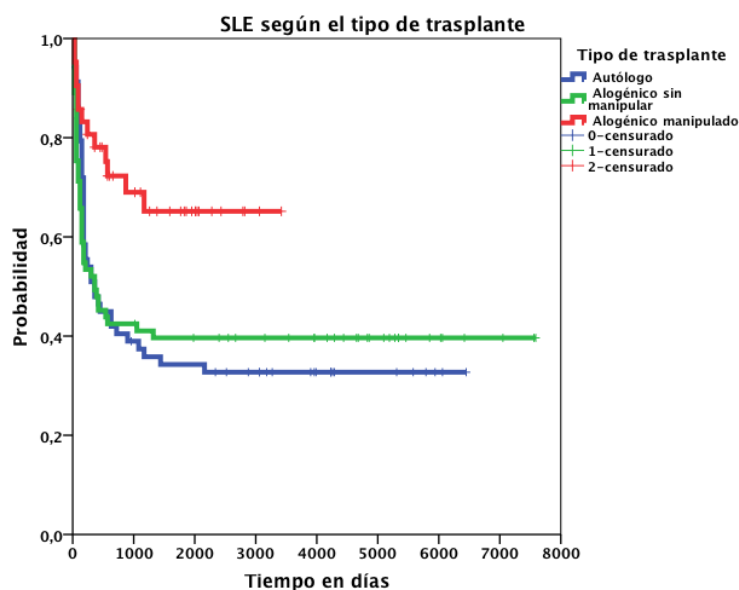
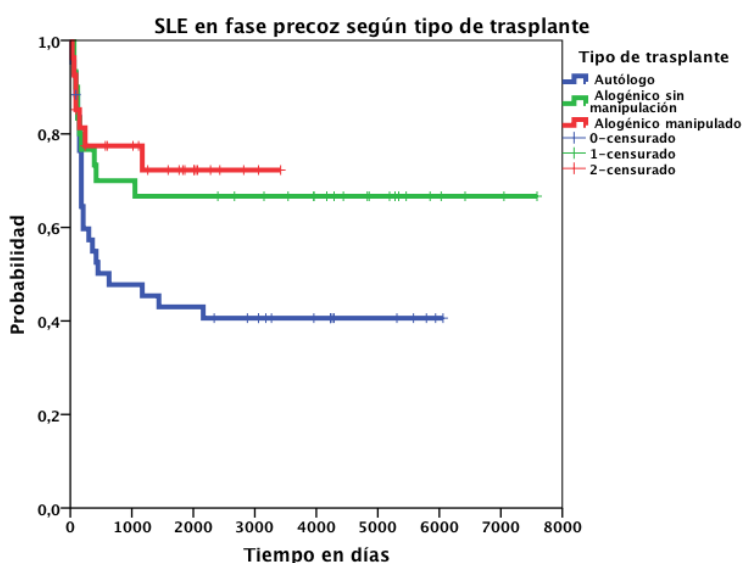


Gráfico 34. Probabilidad de SLE según tipo de trasplante (p global=0,009)

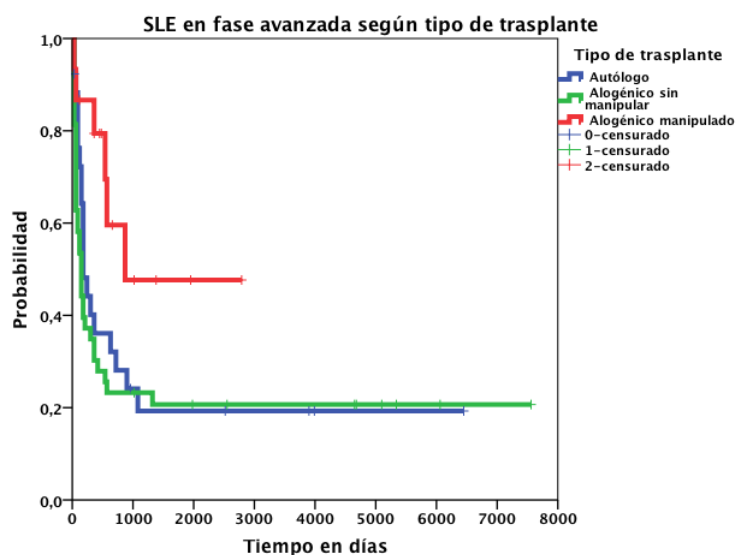
Existen diferencias estadísticamente significativas comparando el trasplante alogénico manipulado con el autólogo ($p=0,003$); y entre el trasplante alogénico con y sin manipulación ($p=0,005$).

En fase precoz de la enfermedad, la probabilidad de SLE en función del tipo de trasplante fue de un $41 \pm 8\%$ en los trasplante autólogos, de un $67 \pm 9\%$ en los alogénicos no manipulados y de un $72 \pm 9\%$ en los alogénicos manipulados. Las diferencias entre probabilidad de SLE son estadísticamente significativas comparando los autólogos con los otros dos grupos (con los alogénicos sin manipular $p=0,05$ y con los manipulados $p=0,03$).

Gráfico 35. Probabilidad de SLE en fase precoz según tipo de trasplante (p global=0,036)

En fase avanzada de la enfermedad, la probabilidad de SLE en los pacientes que recibieron un trasplante autólogo fue de $19 \pm 8\%$, en los que recibieron un trasplante alogénico no manipulado de un $21 \pm 6\%$ y en los que recibieron un trasplante alogénico manipulado de un $48 \pm 16\%$. Existen diferencias estadísticamente significativas al comparar los manipulados frente al resto ($p=0,04$ entre trasplante autólogo y alogénico manipulado y $p=0,01$ entre el trasplante alogénico con y sin manipulación del inóculo).

Gráfico 36. Probabilidad de SLE en fase avanzada según tipo de trasplante (p global=0,036)



6.2. ANÁLISIS DE SLE EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO

6.2.1. ANÁLISIS UNIVARIADO DE SLE EN TRASPLANTE ALOGÉNICO

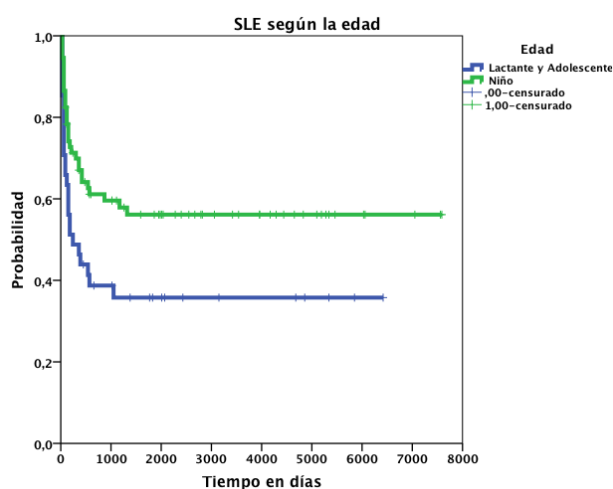
La SLE va a analizarse solo en los pacientes que reciben un trasplante alogénico. La MRT del trasplante autólogo es baja, por tanto casi todos los eventos en este grupo son debidos a la recaída, que ya se ha estudiado de forma pormenorizada, por ser el objetivo primario de este estudio.

La probabilidad de SLE de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico fue de $49 \pm 5\%$.

6.2.1.1. Edad

Los niños tuvieron una probabilidad de SLE superior a los lactantes y adolescentes. La SLE de los niños fue $56 \pm 6\%$ frente a $36 \pm 8\%$ de los pacientes con edades más extremas ($p=0,018$).

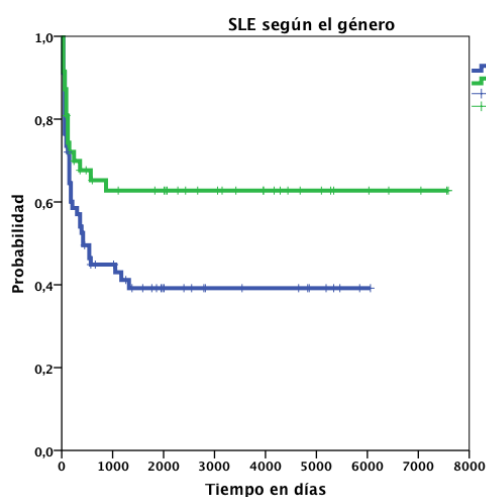
Gráfico 37. Probabilidad de SLE en trasplante alogénico según edad ($p=0,018$)



6.2.1.2. Género

Los pacientes varones presentaron una probabilidad de SLE menor, un $39 \pm 6\%$, frente a un $63 \pm 7\%$ de las niñas ($p=0,034$).

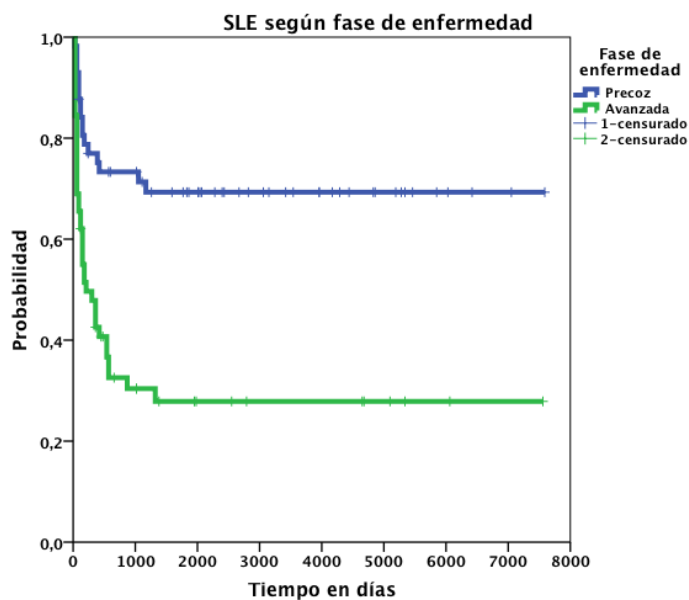
Gráfico 38. Probabilidad de SLE en trasplante alogénico según género ($p=0,034$)



6.2.1.3. Fase de enfermedad

La probabilidad de SLE en los pacientes que se trasplantaron en fase precoz fue muy superior a cuando lo hicieron en fase avanzada. En fase precoz un $69 \pm 6\%$ y en fase avanzada un $28 \pm 6\%$ ($p=0,0001$).

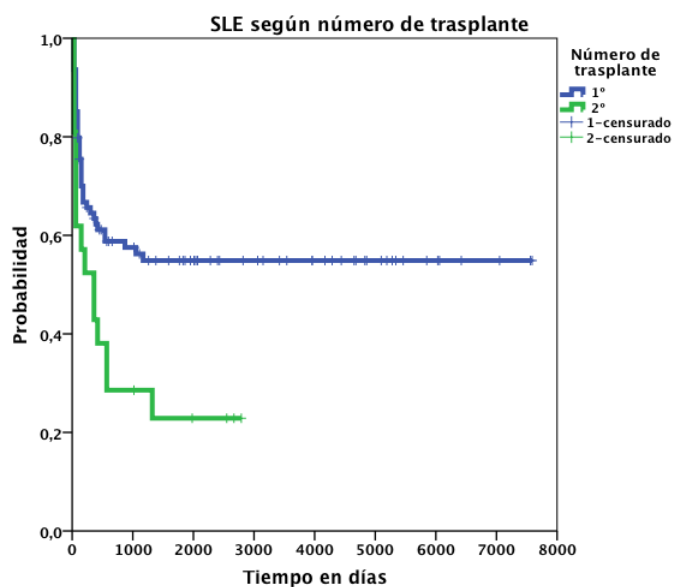
Gráfico 39. Probabilidad de SLE en trasplante alogénico según fase de enfermedad ($p=0,0001$)



6.2.1.4. Número de trasplante

La probabilidad de SLE en los pacientes que recibieron un primer trasplante fue de un $55 \pm 5\%$, frente a un $23 \pm 9\%$ de los que recibieron un segundo trasplante ($p=0,007$).

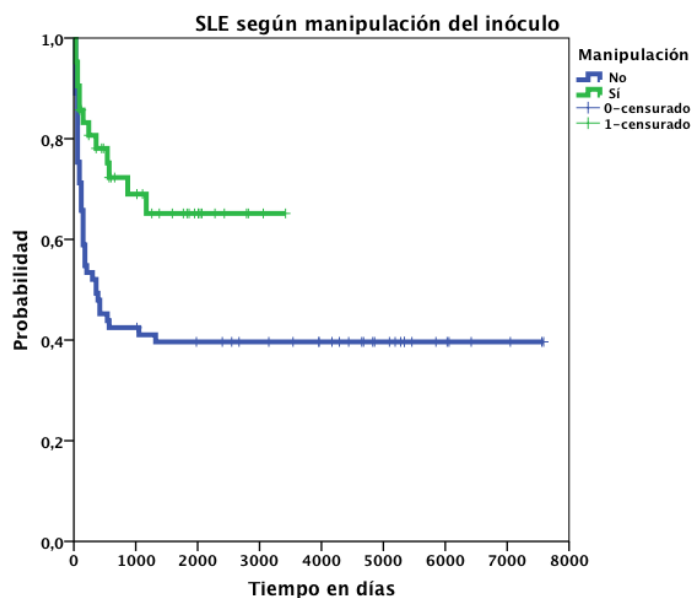
Gráfico 40. Probabilidad de SLE en trasplante alogénico según número de trasplante ($p=0,007$)



6.2.1.5. Manipulación

Los pacientes que recibieron un trasplante alogénico sin manipular tuvieron una probabilidad de SLE de un $40 \pm 6\%$ y los que recibieron un trasplante manipulado de un $65 \pm 8\%$ ($p=0,005$).

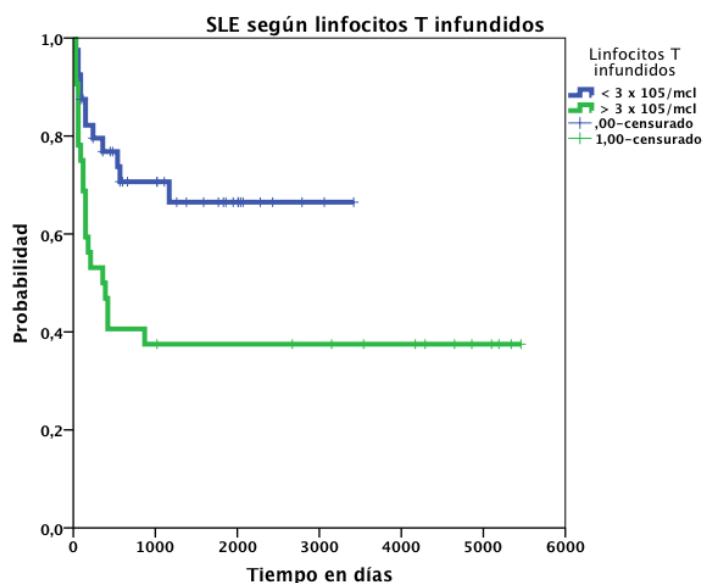
Gráfico 41. Probabilidad SLE en trasplante alogénico según manipulación del inóculo ($p=0,005$)



6.2.1.6. Número de linfocitos T infundidos en el inóculo

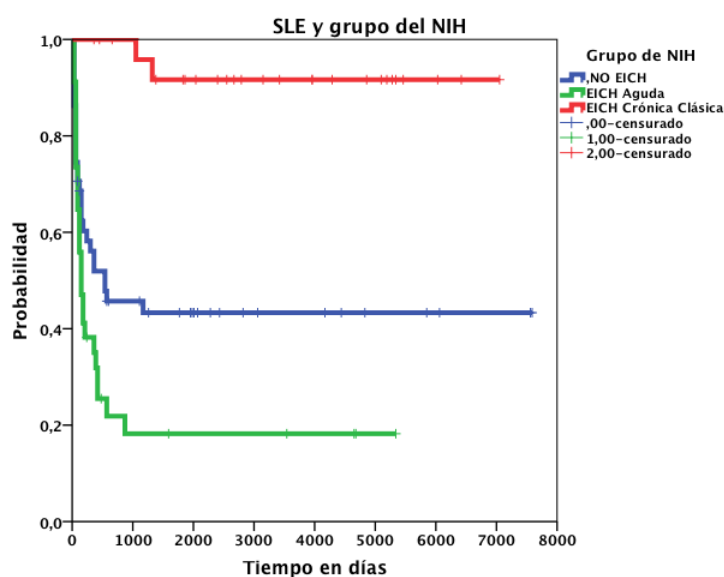
Los pacientes que recibieron menos de 3×10^5 linfocitos T/kg presentaron una probabilidad de SLE de un $66 \pm 8\%$ y los que recibieron más linfocitos T de la mediana de un $37 \pm 9\%$ ($p=0,008$).

Gráfico 42. Probabilidad SLE en trasplante alogénico según Nº linfocitos T del inóculo ($p=0,008$)



6.2.1.7. Presencia de EICH

Los pacientes que no presentaron ninguna forma de EICH tuvieron una probabilidad de SLE de un $43 \pm 7\%$. Sin embargo, los pacientes que desarrollaron una EICH aguda en cualquiera de sus variantes, una probabilidad de SLE de un $18 \pm 7\%$. Y por último, los pacientes que presentaron formas clásicas de EICH crónica tuvieron una probabilidad de SLE mucho más alta de un $92 \pm 6\%$. Comparando los tres grupos, las diferencias son estadísticamente significativas. Entre no presentar EICH y presentar EICH agudo ($p=0,033$); entre no presentar EICH y presentar EICH crónica clásica ($p=0,0001$) y, por último, entre presentar EICH aguda y EICH crónica ($p=0,0001$).

Gráfico 43. Probabilidad de SLE en trasplante alogénico según presencia de EICH ($p=0,0001$)

A continuación, en la tabla 31 se resumen otras variables que, aunque no son estadísticamente significativas en el análisis univariado, sí entrarán en el análisis multivariado de la probabilidad de SLE. El resto de variables no aparecen, ya que no resultaron relevantes en el análisis.

Tabla 31. Análisis univariado de probabilidad de SLE en trasplante alogénico.

Resumen de Variables que rozan significación estadística.

Variable	Opciones de la Variable	Probabilidad de SLE	Significación estadística
Estirpe	Linfoide	$43 \pm 6\%$	0,1
	Mieloide	$60 \pm 8\%$	
Acondicionamiento	Mieloablatoivo	$44 \pm 6\%$	0,1
	Intensidad Reducida	$55 \pm 8\%$	

6.2.2. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE LA SLE EN TRASPLANTE ALOGÉNICO

Se introdujeron las variables edad, género, estirpe de la leucemia, fase de enfermedad en el momento del trasplante, número de trasplante, tipo de acondicionamiento utilizado, manipulación, celularidad de linfocitos T en el inóculo y presencia o no de EICH.

Tabla 32. Análisis Multivariado de SLE en pacientes que han recibido un trasplante alogénico

Variable	HR	IC 95%	p
Edad (niño)	2,49	1,2 - 5,17	0,015
Género (niña)	2,33	1,02 - 5,33	0,045
Fase de Enfermedad (enfermedad precoz)	2,241	1,01 - 4,97	0,047
Manipulación del inóculo	3,98	1,72 - 9,22	0,001
Presencia de EICH aguda	0,32	0,184-0,578	0,0001

HR: *Hazard Ratio*; IC: Intervalo de confianza

Los pacientes con edades entre los 2 y los 12 años, catalogados como niños, frente a los que tienen edades extremas (lactantes y adolescentes) tuvieron dos veces y media más de probabilidades de SLE.

Las niñas tuvieron más el doble de probabilidades de SLE que los niños.

Los pacientes que se trasplantaron con enfermedad en fase precoz tuvieron más del doble de probabilidades de SLE que los que se trasplantaron en fase avanzada.

Los pacientes que recibieron un trasplante con manipulación del inóculo, presentaron una probabilidad de SLE casi cuatro veces superior a los que recibieron un trasplante sin manipular.

Los pacientes que presentaron EICH aguda presentaron una probabilidad de SLE tres veces menor que los que no la presentaron.

7. QUIMERISMO POSTRASPLANTE ALOGÉNICO

A continuación, en la tabla 33, se recogen los datos de evolución del quimerismo en células nucleadas totales (CNT) de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico.

El estudio de quimerismo en subpoblaciones linfocitarias se realizó en muy pocos pacientes que recibieron un trasplante sin manipulación (en 4 pacientes en el periodo postrasplante precoz y en 2 en el resto de los momentos). En la tabla 34 se detalla la evolución del quimerismo en CD3⁺ tras un trasplante con manipulación del inóculo.

Tabla 33: Evolución del quimerismo postrasplante alogénico en células nucleadas totales (CNT)

Tiempo postrasplante y tipo de quimera	No manipulado (Nº pacientes/%)	Manipulado (Nº pacientes/%)	Significación estadística (p)
+30-60 días			
• Quimera mixta	9 (19,6%)	17 (68%)	0,0001
• Quimera completa	37 (80,4%)	8 (32%)	
3 meses			
• Quimera mixta	7 (22,6%)	7 (58,3%)	0,025
• Quimera completa	24 (77,4%)	5 (41,7%)	
6 meses			
• Quimera mixta	5 (20,8%)	9 (75%)	0,002
• Quimera completa	19 (79,2%)	3 (25%)	
1 año			
• Quimera mixta	2 (8,7%)	5 (50%)	0,016
• Quimera completa	21 (91,3%)	5 (50%)	
2 años			
• Quimera mixta	2 (10,5%)	2 (25%)	0,55
• Quimera completa	17 (89,5%)	6 (75%)	

Tabla 34. Evolución del quimerismo postrasplante en subpoblación de linfocitos T (CD3⁺) en pacientes que reciben un trasplante con manipulación del inóculo

Tiempo postrasplante y tipo de quimera	Manipulado (Nº pacientes/%)
+30-60 días	
• Quimera mixta	14 (82%)
• Quimera completa	3 (17%)
3 meses	
• Quimera mixta	17 (63%)
• Quimera completa	10 (37%)
6 meses	
• Quimera mixta	13 (59,1%)
• Quimera completa	9 (40,9%)
1 año	
• Quimera mixta	11 (44%)
• Quimera completa	14 (56%)
2 años	
• Quimera mixta	3 (25%)
• Quimera completa	9 (75%)

8. RECONSTITUCIÓN INMUNE POSTRASPLANTE ALOGÉNICO

8.1. DESCRIPCIÓN DE LA RECONSTITUCIÓN INMUNE POSTRASPLANTE ALOGÉNICO

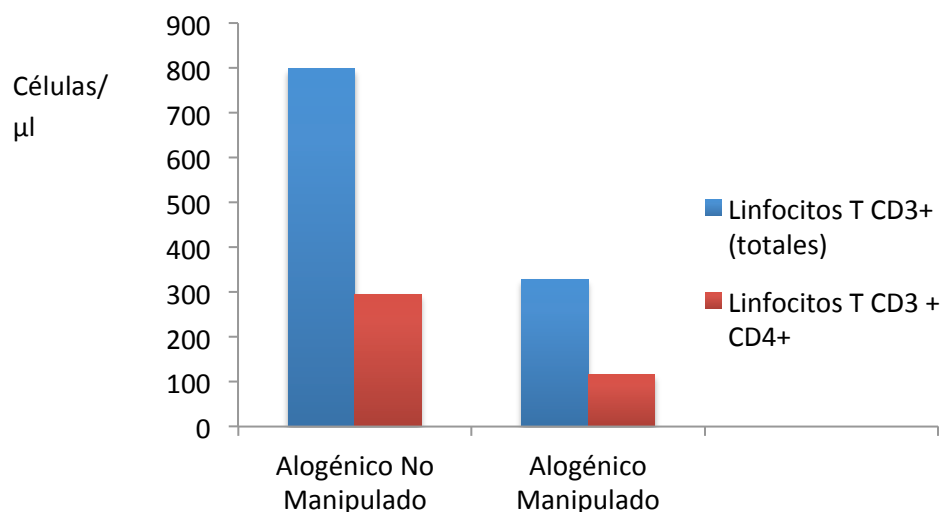
En la tabla 35, se ven comparativamente los datos referentes a las medianas e intervalos de las subpoblaciones linfocitarias en los distintos momentos del estudio, tanto en los pacientes que recibieron un trasplante alogénico no manipulado como los que recibieron un trasplante manipulado. Aparecen en *cursiva* solo los datos que alcanzaron el grado de significación estadística, que se detallan tras la tabla.

Tabla 35. Estudio de reconstitución inmune postrasplante alogénico (células/ μ l)

Tiempo postrasplante	No Manipulados	Manipulados
30-60 días		
• NK	152 (0-889)	166 (3-1269)
• LT totales	798 (91-3396)	327 (7-3109)
• LT CD4 ⁺	295 (43-1189)	116 (5-1673)
• LT CD8 ⁺	372 (32-1980)	166 (1-2590)
• LB	25 (0-1050)	4 (0-1083)
3 meses		
• NK	271 (18-830)	154 (25-343)
• LT totales	757 (29-3633)	791 (141-2832)
• LT CD4 ⁺	373 (9-1166)	240 (54-635)
• LT CD8 ⁺	393 (16-10863)	426 (73-2367)
• LB	156 (1-1353)	306 (0-1329)
6 meses		
• NK	309 (18-885)	146 (15-445)
• LT totales	1077 (26-5545)	1000 (90-2434)
• LT CD4 ⁺	552 (5-2789)	361 (0-1162)
• LT CD8 ⁺	522 (15-2085)	490 (20-1790)
• LB	556 (1-1556)	380 (0-1472)
1 año		
• NK	160 (29-1680)	139 (0-386)
• LT totales	1947 (100-4067)	1316 (152-2733)
• LT CD4 ⁺	617 (65-2615)	517 (65-1441)
• LT CD8 ⁺	979 (24-2285)	573 (77-1694)
• LB	473 (67-3703)	458 (4-1657)
2 años		
• NK	193 (34-1188)	131 (14-551)
• LT totales	2240 (784-3762)	1788 (960-3657)
• LT CD4 ⁺	1329 (214-4308)	893 (353-1548)
• LT CD8 ⁺	925 (287-2656)	701 (269-2330)
• LB	535 (157-1729)	572 (0-1189)

Comparando las medianas de las distintas subpoblaciones linfocitarias en ambos grupos existen diferencias estadísticamente significativas en el momento precoz (30-60 días postrasplante), tanto en el número de linfocitos T totales como de linfocitos T colaboradores (*helper*, CD4⁺). En la determinación entre el mes y los dos meses postrasplante en el grupo de no manipulados la mediana de linfocitos T fue de 798/ μ l y en los manipulados de 327/ μ l ($p=0,045$). Y la mediana de linfocitos T CD4 en el grupo de no manipulados fue de 295/ μ l frente a 116/ μ l en los manipulados ($p=0,001$).

Gráfico 44. Mediana de linfocitos T totales y linfocitos T CD4⁺ día +30-60 postrasplante



La evolución de la reconstitución inmune en los pacientes que reciben un trasplante alogénico sin y con manipulación del inóculo junto con infusiones periódicas del donante, se detalla a continuación, expresadas como medianas de las distintas subpoblaciones linfocitarias, en los gráficos 45 y 46.

Gráfico 45. Cinética de reconstitución inmune en trasplante alogénico no manipulado

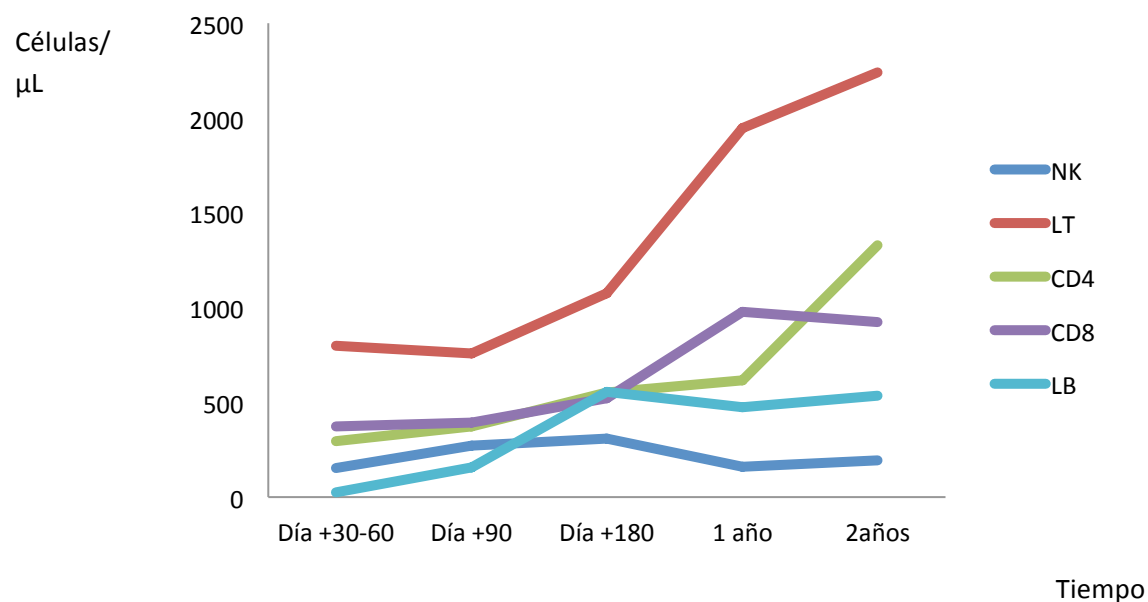
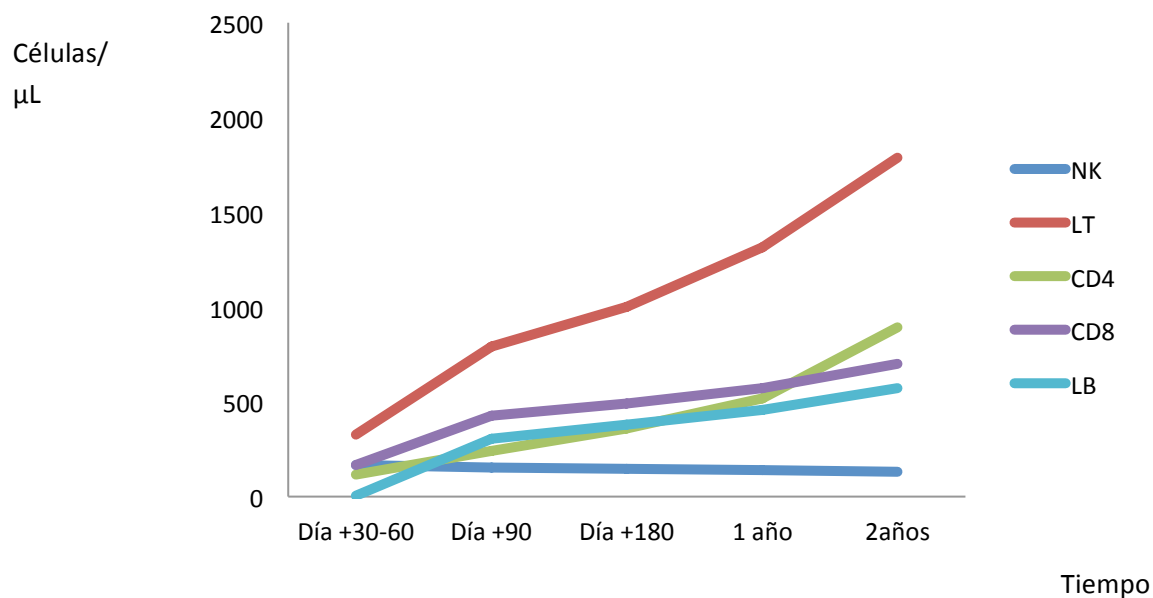


Gráfico 46. Cinética de reconstitución inmune en trasplante alogénico manipulado



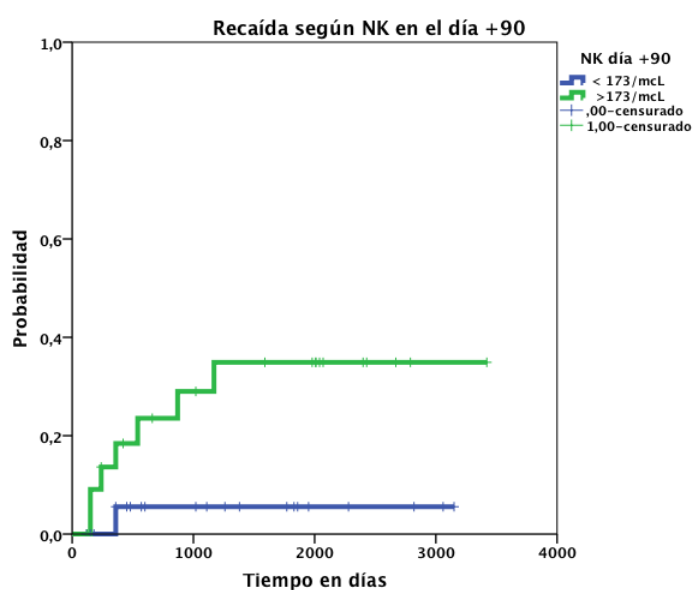
8.2. RECONSTITUCIÓN INMUNE Y PROBABILIDAD DE RECAÍDA

Se estudiaron las subpoblaciones linfocitarias en los distintos tiempos marcados para los estudios de las mismas, y se analizó la probabilidad de recaída con estas variables. Solo se encontraron diferencias en la probabilidad de recaída en función del número de células NK en el día +90 postrasplante.

La mediana de células NK a los tres meses postrasplante fue de 173/ μ L (18-830).

Se encontró diferencia estadísticamente significativa en la probabilidad de recaída de los pacientes que habían recibido un trasplante alogénico, según tuvieran más o menos NK a los 3 meses postrasplante. La probabilidad de recaída en los pacientes que tenían menos NK de 173/ μ L en el día +90 postrasplante fue de un $6 \pm 5\%$, frente a los que tenían más de la mediana de NK con una probabilidad de recaída de $35 \pm 11\%$ ($p=0,04$).

Gráfico 47. Probabilidad de recaída en función de NK en día +90 postrasplante($p=0,04$).



9. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS DOS ESTRATEGIAS DE TRASPLANTE ALOGÉNICO DEL ESTUDIO

Este estudio quiere comparar la evolución de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico con las dos estrategias utilizadas. En la tabla 36 de este apartado, se refleja de forma simplificada, la comparación de la evolución de los pacientes, según recibieran un trasplante con manipulación del inóculo e ILD posteriores o no. Se han comparado las probabilidades de recaída, de desarrollo de enfermedad de injerto contra huésped aguda y crónica, de mortalidad relacionada con el procedimiento y de supervivencia libre de eventos.

Tabla 36. Comparación de probabilidades de evolución en el trasplante alogénico

	No manipulado	Manipulado	p
Recaída	45 ± 6%	31 ± 8%	0,1
EICH aguda	48 ± 8%	18 ± 7%	0,02
EICH aguda grave	26 ± 6%	8 ± 4%	0,015
EICH crónica	55 ± 8%	40 ± 9%	0,1
EICH crónica extensa	53 ± 7%	28 ± 8%	0,037
MRT	28 ± 6%	5 ± 3%	0,008
SLE	40 ± 6%	65 ± 8%	0,005

MRT: Mortalidad relacionada con el trasplante. SLE: Supervivencia libre de eventos

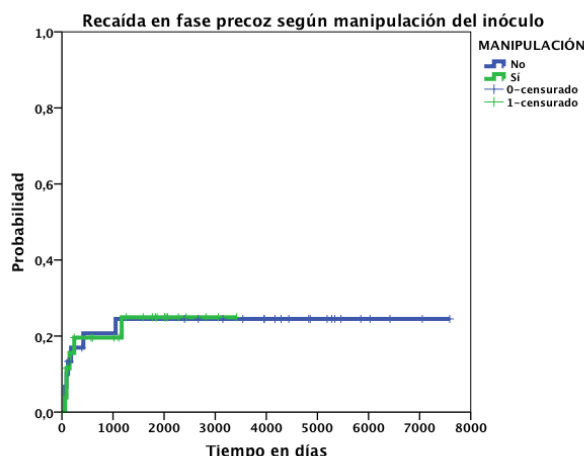
Tanto en la recaída como en la supervivencia libre de eventos se ven influenciada por la fase de enfermedad en la que se trasplantan los enfermos. Por este motivo se desglosan a continuación los resultados de estas probabilidades separados por la fase de la enfermedad.

9.1. COMPARACIÓN DE LA PROBABILIDAD DE RECAÍDA EN LOS DOS TIPOS DE TRASPLANTE ALOGÉNICO EN FUNCIÓN DE LA FASE DE ENFERMEDAD

9.1.1. RECAÍDA EN FASE PRECOZ DE ENFERMEDAD

En los pacientes que se trasplantaron en fase precoz de la enfermedad no se encontraron diferencias en la probabilidad de recaída. La probabilidad de recaída fue de un $25 \pm 8\%$ en los que recibieron un trasplante alogénico sin manipular, frente a un $25 \pm 9\%$ en los que recibieron un trasplante manipulado ($p=0,9$).

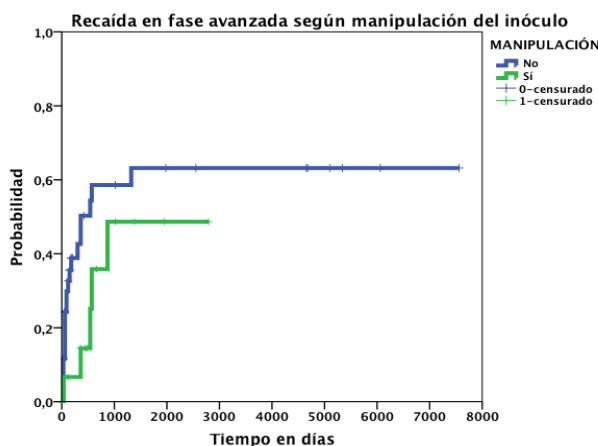
Gráfico 48. Recaída en trasplante alogénico en fase precoz según manipulación ($p=0,9$)



9.1.2. RECAÍDA EN FASE AVANZADA

En los pacientes que se trasplantaron en fase avanzada de la enfermedad, aunque no llegó a alcanzar la significación estadística, se observó que, la probabilidad de recaída fue de un $63 \pm 9\%$ en los que recibieron un trasplante alogénico sin manipular, frente a un $49 \pm 17\%$ en los que recibieron un trasplante manipulado ($p=0,1$).

Gráfico 49. Recaída en trasplante alogénico en fase avanzada según de manipulación ($p=0,1$)

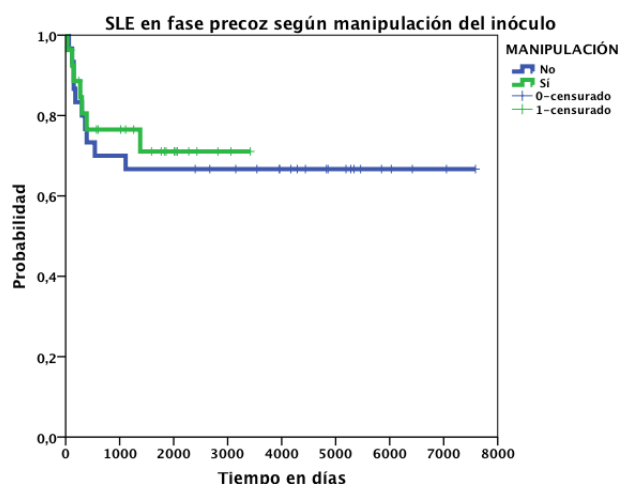


9.2. COMPARACIÓN DE SLE EN LOS DOS TIPOS DE TRASPLANTE ALOGÉNICO EN FUNCIÓN DE LA FASE DE ENFERMEDAD

9.2.1. SLE EN FASE PRECOZ DE ENFERMEDAD

En los pacientes que se trasplantaron en fase precoz de la enfermedad, la probabilidad de SLE fue similar en ambos grupos. De un $67 \pm 9\%$ en los que recibieron un trasplante alogénico sin manipular, frente a un $72 \pm 9\%$ en los que recibieron un trasplante manipulado ($p=0,68$).

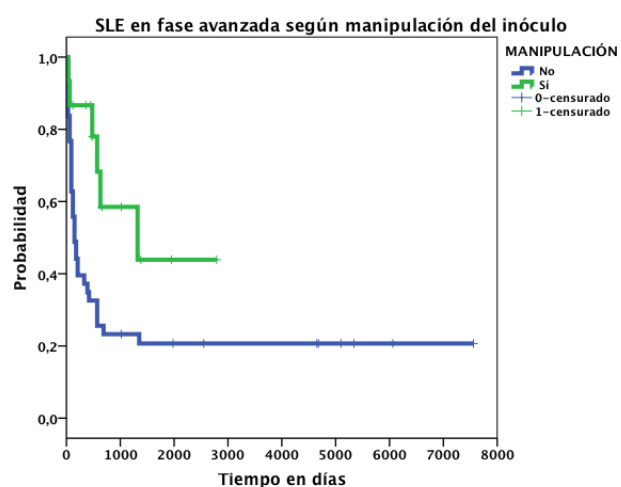
Gráfico 50. SLE en trasplante alogénico en fase precoz según manipulación ($p=0,68$)



9.2.2. SLE EN FASE AVANZADA DE ENFERMEDAD

En los pacientes que se trasplantaron en fase avanzada de la enfermedad, la probabilidad de SLE fue superior en los que recibieron manipulación. La probabilidad de SLE fue de un $21 \pm 6\%$ en los que recibieron un trasplante alogénico sin manipular, frente a un $48 \pm 16\%$ en los que recibieron un trasplante manipulado ($p=0,01$).

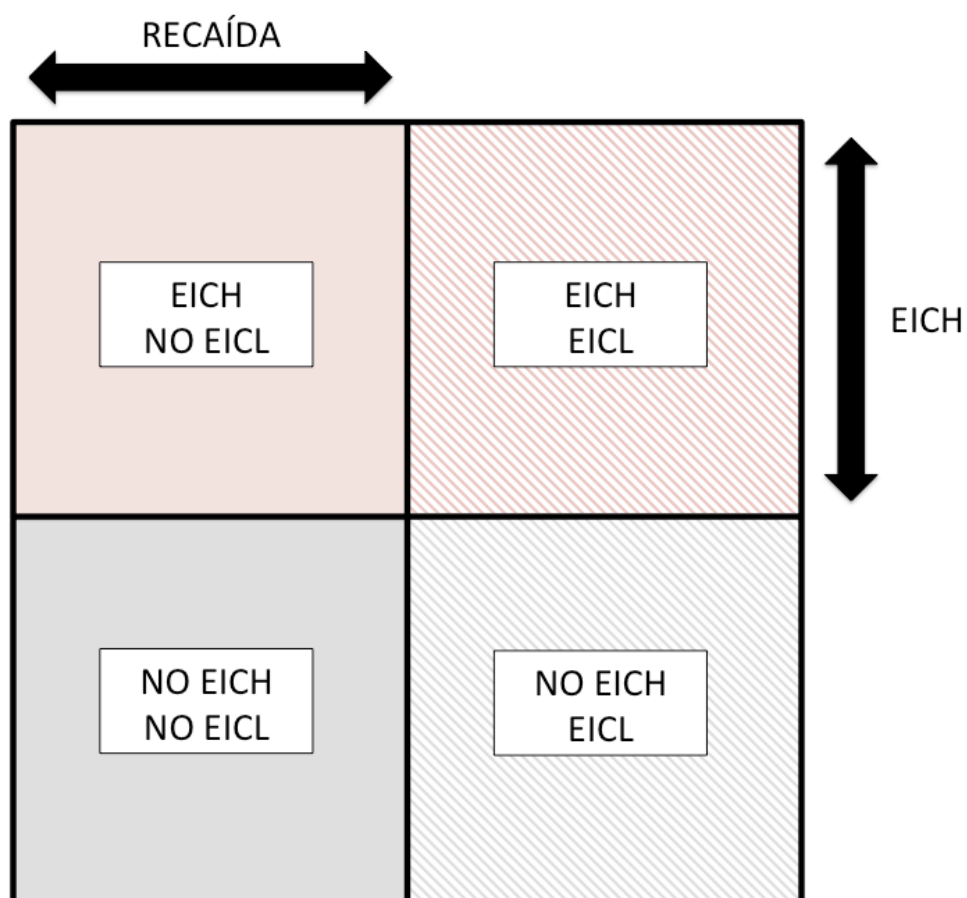
Gráfico 51. SLE en trasplante alogénico en fase avanzada según manipulación ($p=0,01$)



9.3. RELACIÓN ENTRE EICH Y EICL EN LOS DOS TIPOS DE TRASPLANTE ALOGÉNICO

La hipótesis del estudio busca demostrar si existe EICL separado de EICH o si por el contrario ambas entidades tienen que darse unidas. En este punto de los resultados, se realizó una clasificación de los pacientes en distintos cuadrantes según hubieran presentado EICH crónica o no, y hubieran recaído (no EICL) o no (sí EICL). Puede observarse de forma gráfica cómo a la izquierda se han representado a los pacientes que han recaído y a la derecha los que no; y en la fila superior los pacientes que han desarrollado EICH crónica y en la inferior los que no.

Gráfico 52: Cuadrantes de EICH y EICL



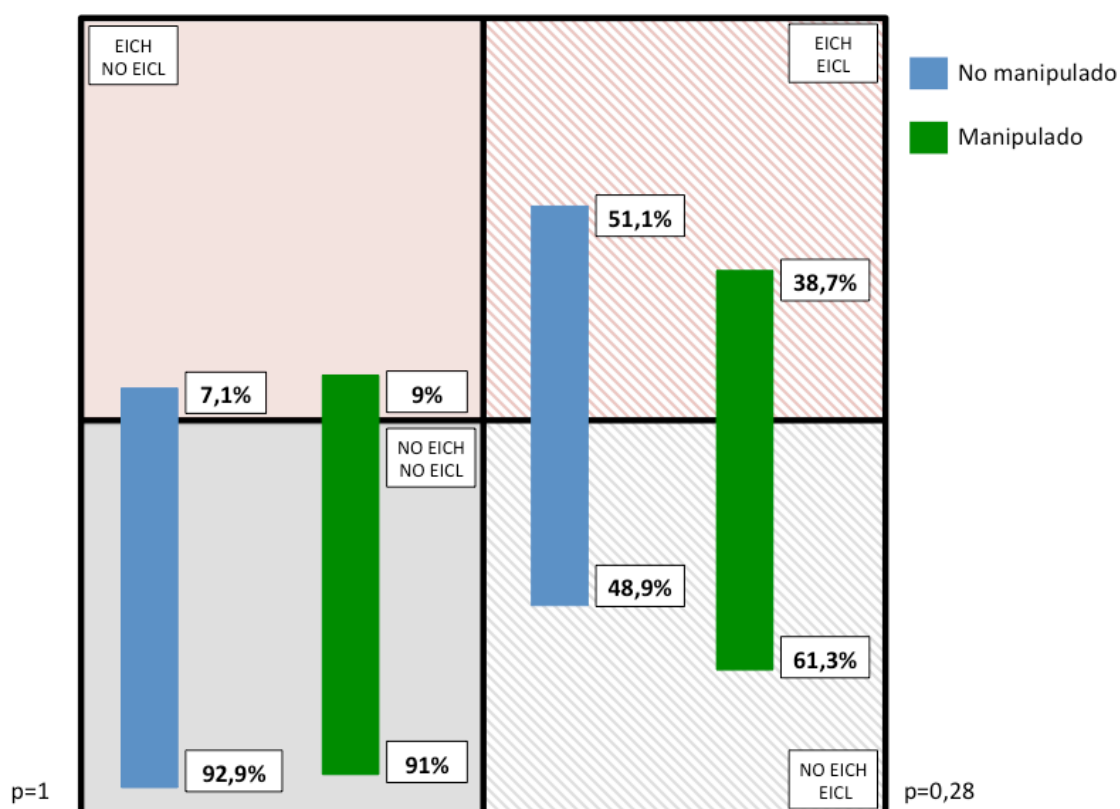
9.3.1. RELACIÓN GLOBAL ENTRE EICH Y EICL

Se han colocado en cada cuadrante correspondiente los pacientes que han recibido un trasplante alogénico sin manipulación (color azul) y con manipulación del inóculo (color verde) y se han representado de forma gráfica en forma de porcentajes.

En el estudio, 39 pacientes tuvieron una recaída (no EICL). 28 recibieron un trasplante no manipulado y 11 un trasplante manipulado. En cuanto a la presentación de EICH, la mayoría, en ambos grupos, no desarrolló EICH crónica. 26 de los 28 que recibieron un trasplante alogénico sin manipular no desarrollaron EICH crónica (92,9%). 10 de los 11 que recayeron con un trasplante manipulado tampoco desarrollaron EICH crónica (91%). Sin diferencias estadísticamente significativas ($p=1$).

En el estudio, 76 de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico no recayeron (sí EICL): 45 con un trasplante no manipulado y 31 con uno manipulado. En cuanto a la presentación de EICH crónica, 23 de los 45 pacientes que recibieron un trasplante sin manipular, desarrollaron EICH crónica (51,1%) y 12 de los 31 pacientes que recibieron un trasplante manipulado también la desarrollaron (38,7%). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,28$).

Gráfico 53. Distribución de los pacientes con trasplante alogénico en función de EICH y EICL



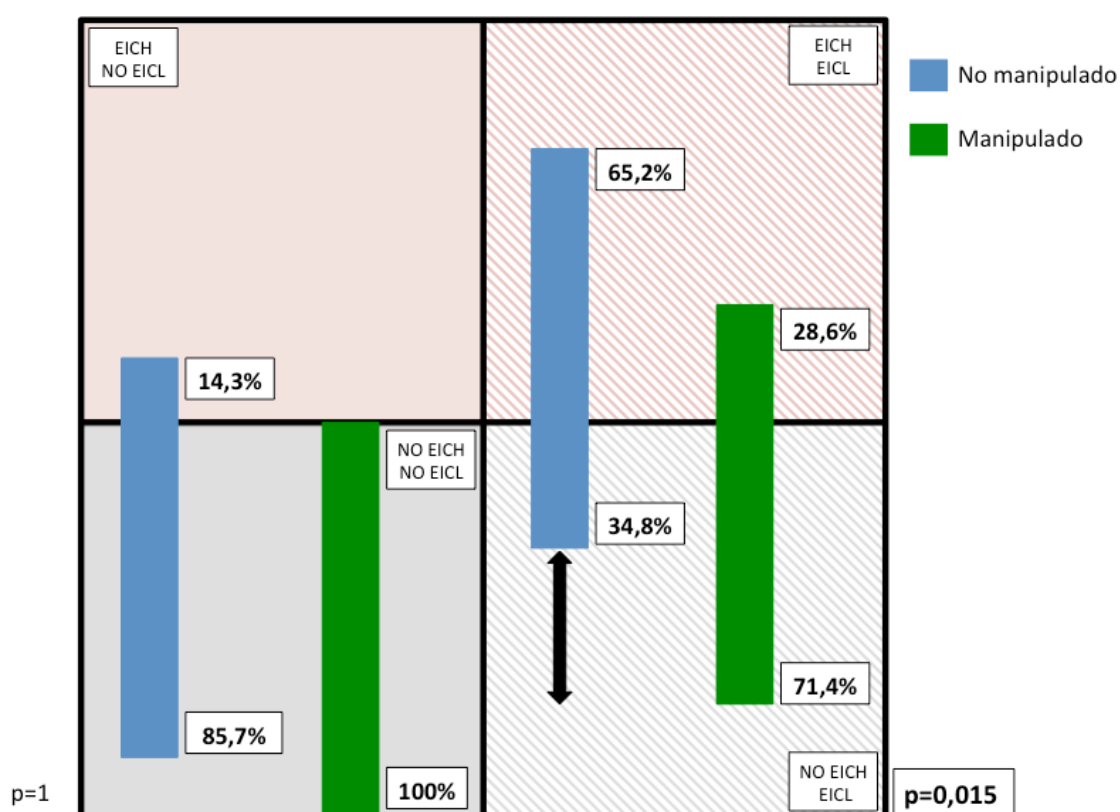
9.3.2. RELACIÓN ENTRE EICH Y EICL EN FASE PRECOZ DE ENFERMEDAD

En el estudio, 13 pacientes que se trasplantaron en fase precoz tuvieron una recaída (no EICL). 7 recibieron un trasplante no manipulado, y 6 un trasplante manipulado. Un solo paciente recayó con EICH crónica. 6 de los 7 que recibieron un trasplante alogénico sin manipular no desarrollaron EICH crónica (85,7%). Y ningún paciente de los que recibió un trasplante manipulado desarrolló EICH crónica (100% sin EICH). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=1$).

En el estudio, 44 de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico en fase precoz no recayeron (sí EICL). 23 con un trasplante no manipulado y 21 con manipulación. En cuanto a la presentación de EICH crónica, 15 pacientes, de los 23 que recibieron un trasplante sin manipular desarrollaron EICH crónica (65,2%) y 6 pacientes, de los 21 que recibieron un trasplante manipulado también la desarrollaron (28,6%).

En 8 pacientes, de los 23 que recibieron un trasplante sin manipular (34,8%) y en 15 pacientes de los 21 que recibieron un trasplante manipulado (71,4%) se consiguió un EICL sin EICH. Estas diferencias sí que resultaron estadísticamente significativas ($p=0,015$).

Gráfico 54. Distribución de los pacientes con trasplante alogénico en fase precoz en función de EICH y EICL

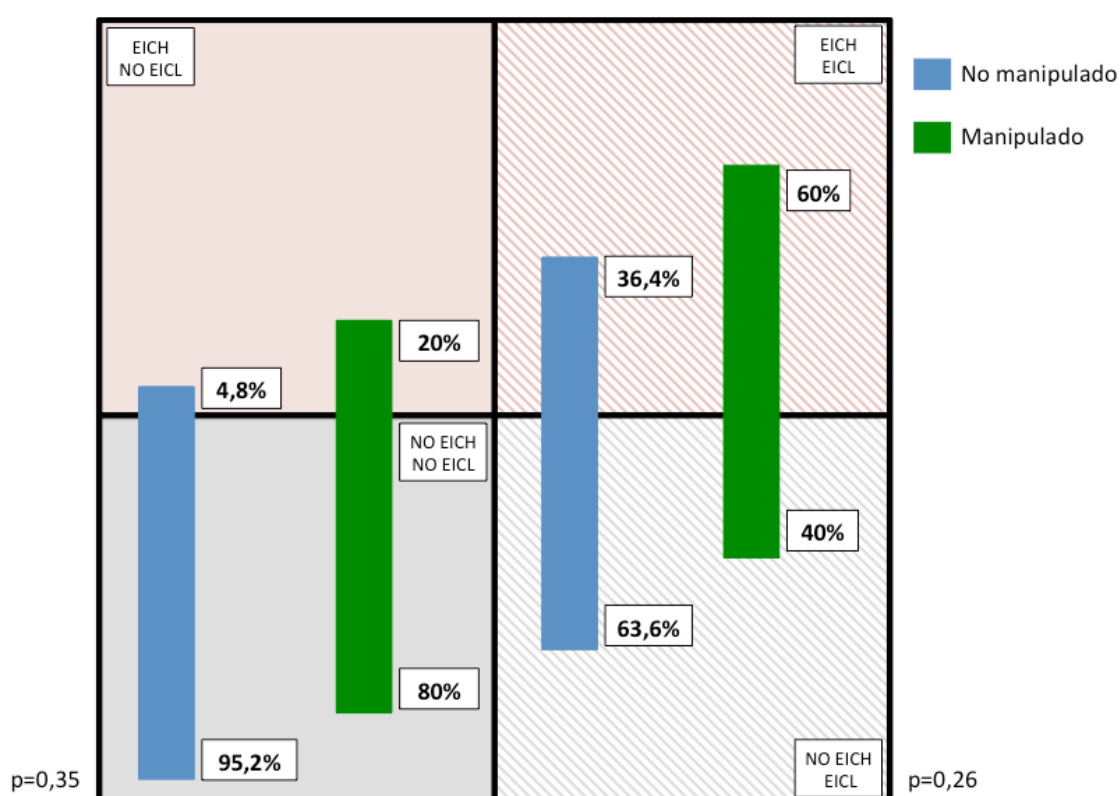


9.3.3. RELACIÓN ENTRE EICH Y EICL EN FASE AVANZADA DE ENFERMEDAD

En el estudio, 26 pacientes que se trasplantaron en fase avanzada tuvieron una recaída (no EICL). 21 recibieron un trasplante no manipulado y 5 un trasplante manipulado. Dos pacientes recayeron con EICH crónica (uno de cada grupo). 20 de los 21 que recibieron un trasplante alogénico sin manipular no desarrollaron EICH crónica (95,2%). Y 4 de los 5 pacientes que recibieron un trasplante manipulado desarrollaron EICH crónica (80%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,35$).

En el estudio, 32 de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico en fase avanzada no recayeron (sí EICL). 22 con un trasplante no manipulado, y 10 con uno manipulado. En cuanto a la presentación de EICH crónica, 8 pacientes de los 22 que recibieron un trasplante sin manipular desarrollaron EICH crónica (36,4%) y 6 pacientes de los 10 que recibieron un trasplante manipulado también la desarrollaron (60%). Sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,26$).

Gráfico 55. Distribución de los pacientes con trasplante alogénico en fase avanzada en función de EICH y EICL



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

A pesar de todos los avances en el área del trasplante de progenitores hematopoyéticos en hemopatías malignas, la recaída sigue siendo la primera causa de fallo del trasplante. La recaída postrasplante se produce aproximadamente en un tercio de los pacientes^(23,24,117-120). En nuestra serie también observamos lo mismo.

Desde los orígenes del trasplante alogénico, se ha descrito la existencia de un fenómeno por el cual el trasplante “cura”, y que va más allá de la propia quimioterapia. A este efecto inmune antitumoral del trasplante, se le denominó efecto injerto contra leucemia (EICL), y en pacientes adultos existen numerosos estudios que lo han demostrado^(87-89,93-95). En pacientes pediátricos existen menos estudios al respecto.

Las células inmunocompetentes del donante pueden provocar una respuesta inmune en el receptor, reaccionando contra las propias células del paciente. Este fenómeno es el responsable de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH)^(5,60-62).

Nuestra hipótesis de trabajo defiende que, aunque ambos efectos, EICL y EICH, suelen coexistir en los pacientes que reciben un trasplante alogénico, mediante estrategias de manipulación, se puede conseguir separar, en parte, estos efectos. Al manipular el inóculo eliminando en parte los linfocitos T, se pretende crear una plataforma libre de EICH sobre la cual generar un EICL, mediante la infusión periódica de linfocitos del donante (ILD) en periodo posterior del trasplante.

A continuación se discutirá sobre los principales hallazgos de nuestro estudio.

El primer hallazgo importante de nuestro estudio es que existe un efecto injerto contra leucemia en el trasplante alogénico. Algo ya demostrado en pacientes adultos⁽⁸⁹⁾, pero escasamente estudiado en pacientes pediátricos con hemopatías malignas, cuyas características biológicas son diferentes. Los pacientes que recibieron un trasplante alogénico presentaron una probabilidad de recaída significativamente menor que los que recibieron un autólogo. Estas diferencias no estuvieron influidas por el acondicionamiento, sino por el efecto aloinmune del injerto, expresado como EICL. Aunque todos los estudios retrospectivos tienen un sesgo de selección, las características de ambas poblaciones (trasplante alogénico y autólogo) son bastantes similares como para explicar estas diferencias en la recaída.

En la literatura no hay muchos estudios que comparen el trasplante autólogo frente al alogénico para tratamiento de hemopatías malignas, y menos aún en población infantil⁽¹²¹⁻¹²⁴⁾. Gupta y colaboradores realizaron un estudio con adultos jóvenes con LLA en primera remisión. En este estudio se concluyó que el trasplante alogénico sí mejoraba la supervivencia y que el trasplante autólogo, comparado con la quimioterapia, no ofrecía beneficios⁽¹²¹⁾. En 2006 la *American Society for Blood and Marrow Transplantation* realizó unas recomendaciones sobre el papel del trasplante hematopoyético en pacientes pediátricos con LLA en las que se concluía que, los resultados a largo plazo comparando trasplante autólogo y alogénico en esos pacientes no se habían estudiado de forma adecuada, por lo que no se podían establecer recomendaciones en ese momento⁽¹²²⁾. En 2008 se realizó otro estudio con indicaciones de trasplante en leucemias, tanto en adultos como en niños⁽¹²³⁾. En niños con LLA se recomendaba trasplante alogénico de donante familiar idéntico, en caso de ser posible, en pacientes que

recaían tras un tratamiento con quimioterapia (en las recaídas tardías recomendaban valorar en cada caso solo quimioterapia frente a trasplante). En niños con LMA de riesgo intermedio o alto, se recomendaba trasplante alogénico en primera remisión completa. En adultos con LMA, el trasplante autólogo continuaba siendo una opción a considerar en pacientes con riesgo intermedio, frente a un trasplante alogénico. Sin embargo, en pacientes con algo de riesgo se recomendaba siempre un trasplante alogénico⁽¹²⁴⁾. Badell y colaboradores publicaron uno de los pocos trabajos que compara ambos trasplantes en niños. En este estudio se comparó el uso de trasplante autólogo frente a alogénico para el tratamiento de la LLA en niños en segunda remisión completa, sin encontrar diferencias en la supervivencia entre unos y otros⁽¹²⁵⁾.

En nuestro estudio, los pacientes que recibieron un trasplante autólogo antes del 2000 presentaron una probabilidad de recaída del doble con respecto a los que lo recibieron después de esa fecha. Una explicación para este hecho puede ser que, con el tiempo, las indicaciones para realizar un trasplante autólogo como consolidación del tratamiento de pacientes pediátricos con hemopatías malignas, se han ido haciendo más restrictivas. Los pacientes del estudio que se trasplantaron después del año 2000 con un trasplante autólogo, fueron muchos menos. Y además, en mejor situación de enfermedad, ya que si no, se les habría indicado la realización de un trasplante alogénico.

Inicialmente los acondicionamientos fueron mucho más intensivos, con toxicidades orgánicas importantes. El desarrollo de los acondicionamientos de intensidad reducida vino por la necesidad de desarrollar acondicionamientos con menos toxicidades y mejor tolerados para pacientes mayores con comorbilidades asociadas, que hacían imposible que pudieran recibir un trasplante con un acondicionamiento mieloablativo^(36,126). El acondicionamiento de intensidad reducida disminuye la incidencia de EICH aguda grave (minimiza el daño que se produce en la primera fase de la fisiopatología de la EICH aguda).

En la población pediátrica, el uso de acondicionamiento de intensidad reducida disminuye efectos secundarios graves y permanentes, como el retraso del crecimiento, la esterilidad o las alteraciones endocrinas, que se mantendrán durante toda la edad adulta^(35,37,39).

El acondicionamiento de intensidad reducida produce un estado de quimerismo mixto en el receptor, que es un escenario adecuado sobre el cual realizar inmunoterapia adoptiva, mediante la infusión de linfocitos del donante para aumentar el efecto antileucemia del trasplante^(35,98).

El acondicionamiento de los pacientes de nuestro estudio fue diferente según la estrategia de trasplante. Todos los pacientes con un trasplante autólogo recibieron un acondicionamiento mieloablativo. De los pacientes que recibieron un trasplante alogénico sin manipulación, la mayoría recibieron también un acondicionamiento mieloablativo y, casi todos los que recibieron un trasplante con eliminación de linfocitos T recibieron un acondicionamiento de intensidad reducida basado en fludarabina. En los pacientes que recibieron un trasplante alogénico, no se encontraron diferencias estadísticas en la probabilidad de recaída, ni en la supervivencia libre de enfermedad, en función del tipo de acondicionamiento utilizado. Estos datos son concordantes con otros estudios que comparan distintos tipos de acondicionamiento.⁽³⁸⁾ Lo que sí es importante señalar, es que el uso de acondicionamiento

mieloablato en estos pacientes, aumentó en 7 veces la probabilidad de desarrollar una EICH aguda grave, comparándolo con el acondicionamiento de intensidad reducida. Existe una asociación directa entre el tipo de acondicionamiento y la estrategia de eliminación de linfocitos T del inóculo; y puede que la diferencia en la probabilidad de desarrollo de EICH aguda guarde también relación con la cantidad de linfocitos T infundidos en el momento del trasplante, y no solo con el acondicionamiento previo.

Ni el acondicionamiento mieloablato ni el uso de irradiación corporal total en nuestra serie se han relacionado con diferencias en la probabilidad de recaída o en la supervivencia libre de eventos. Estos datos apoyan el uso de acondicionamientos de intensidad reducida en población pediátrica, con menos toxicidad, menos secuelas a largo plazo y sin aumentar el riesgo de recaída.

Otro hallazgo a destacar de nuestro estudio es que la recaída postrasplante alogénico estuvo claramente influenciada por la fase de enfermedad del paciente y por la presencia de EICH crónica.

Es casi una constante en todos los estudios que la fase de enfermedad influye en la probabilidad de recaída, incluido un estudio del registro de la EBMT (*European Society for Blood and Marrow Transplantation*) que incluye casi 50.000 pacientes⁽¹²⁷⁾. En nuestro estudio se observó que la fase de enfermedad impactaba en la recaída. En el análisis univariado de probabilidad de recaída, los pacientes que se trasplantaron en fase precoz presentaron una probabilidad de recaída en torno al 25 %, y más del doble en los que se trasplantaron en fase avanzada de la enfermedad. En el análisis multivariado se observó que la probabilidad de recaída de los pacientes trasplantados con enfermedad avanzada fue casi el triple comparada con los que se trasplantaron en fase precoz.

En una revisión de casi 800 pacientes trasplantados se observó cómo aumentaba el riesgo relativo (RR) de recaída en función de la fase de enfermedad al trasplante: en primera remisión completa RR 1 (basal), en segunda remisión completa RR de casi 2 y, si el paciente se trasplantó con enfermedad el RR para presentar recaída aumentó hasta casi 6⁽¹¹⁷⁾.

El otro factor que impactó significativamente en la probabilidad de recaída en nuestro estudio, fue la presencia de enfermedad de injerto contra huésped crónica. En nuestra serie, la probabilidad de recaer fue significativamente menor en aquellos pacientes que presentaron alguna forma de EICH crónica frente a los que no la desarrollaron. En el análisis univariado, la probabilidad de recaída de los pacientes que presentaron EICH crónica fue de un 10% frente casi un 60% en los que no presentaron EICH crónica. En el análisis multivariado se observó que presentar EICH crónica disminuyó la probabilidad de recaída casi diez veces con respecto a los que no la tenían. Existe un potente EICL asociado a la EICH crónica, que ha sido descrito ya por otros estudios^(117,127-129).

La clasificación de la EICH ha cambiado en los últimos años, ya que las manifestaciones y el tiempo de aparición de la clínica se han visto modificados por el uso de nuevas fuentes de progenitores y por el uso de distintas estrategias de profilaxis de la EICH. En nuestro estudio se ha comprobado cómo varía la probabilidad de recaída en función de la presencia o no de EICH crónica, según se utilizara el sistema de clasificación clásica o el sistema propuesto por el NIH que se basa en las características de las manifestaciones clínicas y no en la temporalidad⁽⁸²⁾. En el análisis multivariado de la recaída se observó cómo la fuerza con la que la EICH crónica se

asociaba a la recaída variaba de forma sustancial según el sistema de clasificación de la EICH utilizado. Al utilizar el sistema clásico, la probabilidad de recaída en los pacientes que tenían EICH crónica disminuyó casi seis veces con respecto a los que no, y, si se utilizaron los criterios de la NIH modificado⁽¹¹⁶⁾, presentar EICH crónica disminuyó la probabilidad de recaída casi diez veces. Esta diferencia de casi 4 veces en el análisis multivariado radica en el hecho de que, con la clasificación temporal, pacientes que se habían clasificado como pacientes con EICH crónica (porque habían desarrollado sus síntomas a partir del día más 100), en realidad tenían formas tardías de la EICH aguda, que como se ha visto en el análisis de resultados no tiene un EICL asociado, como ocurre con la EICH crónica. La clasificación, por tanto, basada en los criterios de consenso de la NIH parece ser más adecuada para la valoración de la presencia de EICH crónica y su correcto impacto en la recaída de los pacientes, demostrando la asociación entre EICH y EICL⁽¹¹⁶⁾. Esta clasificación está comenzando a utilizarse ya, en estudios de morbilidad a largo plazo por EICH crónica en pacientes pediátricos⁽¹³⁰⁾.

La eliminación de linfocitos T del inóculo ha demostrado ser una forma muy eficaz para prevenir el desarrollo de la EICH. Estas técnicas de eliminación de linfocitos T conseguían disminuir la aparición de EICH y la mortalidad relacionada con la misma, pero llevaban asociadas efectos indeseables como un aumento de las recaídas, de fallo de injerto y un retraso en la reconstitución inmune que favorecía infecciones^(41,84,97,131). El aumento de recaídas se explica porque el EICL está íntimamente relacionado con los linfocitos T del donante. Este hecho, que está estudiado ampliamente en adultos, está menos estudiado en población pediátrica^(132,133).

Para intentar disminuir esa pérdida de efecto antitumoral que se producía al realizar eliminación de linfocitos T del inóculo, se comenzaron a utilizar infusiones de linfocitos T de forma diferida postrasplante, cuando el daño sobre los tejidos del acondicionamiento había disminuido^(102,134,135).

El uso de ILD postrasplante puede realizarse buscando distintos objetivos⁽¹³¹⁾. El primero es el tratamiento de la recaída postrasplante; esto ha resultado muy útil, sobre todo, en pacientes adultos con LMC, aunque también se han utilizado en recaídas de leucemias agudas^(93,95,97,131). Otro de los objetivos que persigue es conseguir un quimerismo completo del donante en pacientes que tienen quimerismo mixto^(102,105). Y por último, mejorar la reconstitución inmune para evitar o tratar infecciones⁽¹³⁶⁾.

Revisando la literatura se observa que, casi todos los estudios de ILD postrasplante utilizan estas infusiones como tratamiento de la recaída, que puede ser una recaída franca o solo con EMR positiva^(98,99,131). También se utilizan las ILD como tratamiento anticipado (*preemptive*)⁽¹⁰²⁾, que consiste en realizar las ILD cuando se comienza a ver un aumento de quimerismo autólogo (aumento del quimerismo mixto), para intentar volver a la situación de quimerismo completo. El uso de ILD tiene muchas limitaciones para tratamiento de la recaída de pacientes pediátricos, que en la mayoría de los casos presentan leucemias agudas con elevada carga tumoral.

Hay pocos estudios sobre el uso de ILD de forma profiláctica, para potenciar el EICL asociado a la propia ILD antes de que se produzca la recaída. En niños, existen aún menos trabajos que estudien las ILD como tratamiento profiláctico^(103,106,131).

En nuestro estudio, en los pacientes que recibieron un trasplante con manipulación del inóculo y eliminación parcial de linfocitos T, el uso de ILD estaba programado como parte de la estrategia de trasplante y no buscaba, ni conseguir un quimerismo completo, ni tratar una EMR positiva. De hecho, para que se siguieran administrando las ILD programadas, era imprescindible que el paciente no tuviera quimera completa; no solo por el aumento de riesgo de EICH tras la ILD, sino porque cuando existe un quimerismo completo, la adición de linfocitos del donante no conlleva un EICL tan potente como el que se consigue con quimera mixta, como ya demostró Mapara en sus modelos murinos^(137,138).

La selección de progenitores hematopoyéticos (selección de CD34⁺), mediante la tecnología del CliniMACS, permite obtener una población de progenitores purificada. La eliminación de linfocitos T ha tenido distintas limitaciones a su uso, como el aumento de las recaídas y de fallo del injerto.

En nuestra estrategia, tras la selección de los progenitores (CD34⁺), para asegurar el injerto, se añadió una cantidad establecida de linfocitos T (3×10^5 /kg). Este número de linfocitos T fijo para añadir en el inóculo, se estableció según lo propuesto por Urbano y colaboradores⁽⁴³⁾. Por tanto, esta técnica es una eliminación parcial de linfocitos T, ya que, a una técnica de eliminación casi total de linfocitos T (mediante selección de CD34⁺) se le suma la adición de una cantidad fija de linfocitos T en el momento de la infusión. Y para intentar disminuir las recaídas, se busca potenciar el EICL mediante infusiones periódicas de linfocitos del donante en un segundo tiempo, iniciándose al mes postrasplante, cuando el daño del acondicionamiento ha disminuido⁽¹³⁹⁾.

En la literatura encontramos dos grandes grupos según los objetivos que se persigan con la infusión de linfocitos del donante. Por un lado, los que utilizan las ILD como estrategia para volver a una situación de quimerismo completo. Por otro lado, los que utilizan las ILD en el seno de una quimera mixta estable, no para obtener un quimerismo completo, sino para potenciar el EICL sobre esa plataforma.

Dentro del primer grupo, Bader y colaboradores realizaron distintos estudios en población pediátrica con leucemias agudas (linfoblásticas y mieloblásticas estudiadas por separado) que recibieron un trasplante alogénico^(104,105,140,141). La estrategia que utilizaron fue utilizar inmunoterapia en los pacientes que tenían un incremento progresivo en el quimerismo mixto para intentar volver a una situación de quimerismo completo. En estos pacientes se realizaba de forma rutinaria, semanalmente, estudio de quimerismo hasta el día +100 y después, mensualmente. Básicamente, esta inmunoterapia consistía en retirar la inmunosupresión si el paciente estaba con ella y, si en unas semanas el quimerismo mixto no disminuía o aumentaba, utilizar bajas dosis de ILD. Si el paciente no tenía inmunosupresión en el momento de presentar aumento del quimerismo mixto, recibía directamente ILD. Si después de 3-4 semanas el paciente persistía con un quimerismo mixto se le administraba una nueva ILD. Los estudios de este grupo demostraron, en primer lugar, que los pacientes que tenían un aumento de quimerismo mixto tenían más recaídas que los que permanecían con quimera completa o con un mínimo quimerismo mixto estable; y en segundo lugar, que el uso de inmunoterapia postrasplante en aquellos pacientes que presentaron aumento del quimerismo mixto aumentaba la supervivencia con respecto a los que no recibieron ningún tratamiento.

Horn y colaboradores siguen esta línea de uso de ILD; también utilizaron la inmunoterapia (retirar la inmunosupresión y añadir ILD) en pacientes con quimera mixta, para intentar

obtener una quimera completa. Los pacientes que recibieron inmunoterapia tuvieron una SLE similar a los que tenían quimerismo completo de forma espontánea⁽¹⁰⁹⁾.

Rujkiyanont y colaboradores también buscaron utilizar ILD en pacientes pediátricos para convertir un quimerismo mixto en completo; y comprobaron que aquellos que conseguían volver a una quimera completa tenían menos recaídas comparados con los que permanecían con quimera mixta⁽¹⁰⁷⁾. Este estudio se realizó utilizando distintos donantes y con dosis variables de linfocitos en las ILD en función del tipo de donante.

La otra estrategia basa el uso de ILD en el seno de una quimera mixta estable, y no con el objetivo de conseguir una conversión a quimerismo completo. Esta corriente está liderada por el grupo de Sykes. Se busca una quimera mixta de forma intencionada sobre las que administrar ILD para potenciar el EICL sin aumentar EICH.

Spitzer propuso que podía existir un EICL en ausencia de EICH si se retrasaba en el tiempo la infusión de linfocitos hasta un periodo postrasplante en el que la inflamación tisular, producida por el acondicionamiento, hubiera disminuido⁽¹³⁹⁾.

Siguiendo esta línea de intentar potenciar el EICL sin desarrollar EICH, Pérez y colaboradores realizaron un estudio prospectivo en el que se incluyeron 22 pacientes pediátricos⁽¹⁰⁶⁾. Estos pacientes recibieron un trasplante alogénico con sangre periférica movilizada, utilizando un acondicionamiento de intensidad reducida basado en fludarabina para conseguir un quimerismo mixto estable sobre el cual realizar infusiones periódicas programadas del donante, para mejorar la reconstitución inmune y potenciar el EICL. Los pacientes presentaron una cinética de injerto leucoplaquetar comparable a los trasplantes alogénicos sin manipular. La MRT fue muy baja, ya que los pacientes, por un lado, no presentaron toxicidades secundarias a daños producidos en el acondicionamiento y, por otro lado, había ausencia de EICH grave. El uso de ILD se asoció a una rápida recuperación de todas las subpoblaciones de linfocitos T, sin detectarse infecciones graves. Por último, la tasa de recaídas (aunque la mediana de seguimiento fue de 15 meses) fue equiparable a las que publicaban otras series pediátricas que utilizaban diferentes fuentes.

En cuanto a la dosis de infusión de linfocitos T en cada ILD, tampoco hay recomendaciones claras. La cantidad de 1×10^6 linfocitos T/Kg fue la elegida en nuestros pacientes, pero hay otros estudios que utilizan dosis 10 veces superiores de inicio, y que van aumentándose en las sucesivas infusiones^(107,134). Si bien es cierto que, algunos de estos estudios, buscan conseguir una conversión a un quimerismo completo como estrategia para evitar la recaída. Por otro lado, en algunas patologías como la LMC se ha visto que un número mayor de linfocitos T en cada infusión conlleva un riesgo aumentado de desarrollo de EICH aguda⁽⁹⁷⁾.

La infusión de linfocitos del donante puede provocar en el paciente el desarrollo de una enfermedad de injerto contra huésped o una aplasia posterior. En nuestra serie menos de un tercio de los pacientes presentaron EICH aguda tras la ILD. La mayoría presentó EICH aguda leve y ninguno de los pacientes desarrolló EICH grado IV. Estos datos concuerdan con los descritos en la literatura, tanto en porcentaje como en gravedad de la EICH post-DLI, ya que, al igual que en otros estudios, la EICH aguda que se produce tras la ILD no suele ser grave, y responde bien al tratamiento esteroideo^(97,100). Ninguno de nuestros pacientes presentó una situación de aplasia tras la ILD. Aunque la incidencia de la aplasia tras la ILD varía según las series entre un 20-40%⁽⁹⁷⁾, esta suele producirse en pacientes con LMC que reciben

tratamiento de recaída de la leucemia con linfocitos del donante. Una explicación al por qué los pacientes de nuestro estudio no desarrollaron aplasia tras la ILD sería que estos pacientes reciben ILD de forma programada y sin evidencia de enfermedad.

Existe controversia sobre si el desarrollo de EICH tras la infusión de linfocitos lleva asociada o no un aumento del EICL. Hay autores que sostienen que la aparición de EICH aguda tras la infusión de linfocitos predice una mejor SLE^(97,108). Y sin embargo, hay otros que sostienen que no presentar EICH tras la ILD no significa perder EICL⁽¹⁰⁷⁾. Analizando los datos de nuestros pacientes que recibieron ILD, no encontramos diferencias en la recaída entre los que desarrollaron EICH aguda tras la ILD y los que no.

En nuestro estudio se utilizaron dos estrategias de trasplante alogénico: una en la cual los pacientes recibían un trasplante sin manipulación del inóculo, y otra en la que los pacientes recibían un trasplante con eliminación parcial de linfocitos T seguido de administraciones periódicas de linfocitos del donante postrasplante. Con respecto a la probabilidad de recaída, resaltar que los pacientes que recibieron un trasplante manipulado no presentaron mayor probabilidad de recaída sino que, incluso, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo, se observó una menor probabilidad de recaída comparándolos con los que recibieron un trasplante sin manipulación del inóculo.

Que los pacientes que recibieron un trasplante de progenitores hematopoyéticos con eliminación parcial de linfocitos T no recayeran más que los que recibieron un trasplante sin estrategia de manipulación parece contrastar, en principio, con lo descrito en la literatura, ya que la eliminación de linfocitos T se ha asociado a aumento de las recaídas^(41,84). Una de las posibles explicaciones para este hecho, podría pensarse que es por las características de la enfermedad de los pacientes (un mayor número de pacientes en fase avanzada de la enfermedad en el grupo de trasplante sin manipular); aunque al comparar la probabilidad de recaída entre no manipulados y manipulados, separándolos por fase de enfermedad, se comprobó que, en fases precoces, la probabilidad de recaída fue similar independientemente de la estrategia de trasplante utilizada y que, en fases avanzadas, la probabilidad de recaída de los pacientes que recibieron un trasplante manipulado fue menor que la de los no manipulados, aunque tampoco alcanzó la significación estadística. Otra explicación que sugerimos, es que el EICL fue más potente en los pacientes que recibieron un trasplante manipulado ya que se desarrolló sobre una plataforma de quimera mixta, como aportan los estudios de Mapara^(137,138). Conseguir de forma intencionada un quimerismo mixto estable tras un trasplante alogénico permite la administración programada de ILD con bajo riesgo de aparición de EICH, manteniendo el efecto antitumoral (EICL)⁽¹⁰⁶⁾.

Al igual que en otros estudios, se ha podido observar en los pacientes de nuestro estudio que la adquisición de un quimerismo completo precoz postrasplante condicionó el desarrollo posterior de EICH crónica⁽²³⁾.

En el periodo postrasplante inmediato se pueden dar dos situaciones. Por un lado, los pacientes que consiguen quimera completa precoz, con alta probabilidad de desarrollar EICH crónica y con baja tasa de recaídas, pero, con una alta incidencia de EICH grave que en muchas ocasiones pueden comprometer de forma importante la vida del paciente. Y, por otro lado, los

pacientes que no presentan quimera completa precoz (quimera mixta), con menos EICH crónica y con un aumento de probabilidad de recaída.

Conociendo estas premisas, puede diseñarse una estrategia de trasplante diferente. Los pacientes que reciben un trasplante sin manipulación del inóculo, que reciben el número total de linfocitos T en el momento de la infusión, van a presentar con una alta probabilidad un quimerismo completo, que condicionará en un porcentaje alto de pacientes una EICH crónica. En este tipo de trasplante, como se ha podido comprobar, el EICL está íntimamente ligado a la presencia de EICH crónica. La Dra. González Vicent realizó un estudio en pacientes pediátricos con trasplante alogénico sin manipulación y acondicionamiento mieloablativo, y estudió la adquisición de quimerismo completo de forma precoz. La probabilidad de desarrollo de EICH crónica en los que presentaban quimera completa precoz fue casi del doble de los que tenían quimera mixta. La adquisición de una quimera completa precoz disminuyó la probabilidad de recaída⁽²³⁾.

Sin embargo, en los pacientes que reciben un trasplante con eliminación parcial de linfocitos T podemos encontrar dos situaciones: por un lado, los que presentan quimera completa precoz y desarrollan EICH crónica y por otro lado, los que permanecen con quimera mixta que no desarrollarán EICH crónica. Sobre este último subgrupo de pacientes (quimera mixta sin EICH) la infusión de linfocitos del donante (ILD) va a producir un EICL separado de la EICH crónica. Esta estrategia de manipulación permite separar, en parte, el EICL del EICH. En nuestro trabajo, de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico y no desarrollaron EICH, aquellos que recibieron un trasplante manipulado con ILD posteriores recayeron menos que los que recibieron un trasplante sin manipular. Aunque esto puede parecer paradójico, demuestra que la plataforma de quimera mixta sobre la cual se infunden linfocitos T del donante, tiene efecto antitumoral sin necesidad de desarrollar EICH ni aguda ni crónica^(106,139).

Volviendo a los resultados de nuestro trabajo, se encontraron diferencias en el estudio del quimerismo entre el trasplante con y sin manipulación. Estas diferencias fueron significativas en todos los momentos postrasplante exceptuando a los dos años postrasplante. El trasplante sin manipulación consiguió en los pacientes, de forma mayoritaria y precoz, un quimerismo completo, mientras que el trasplante con manipulación del inóculo presentó una quimera mixta, sobre la cual realizar infusiones de linfocitos del donante. Esta quimera mixta que presentaron los pacientes que recibieron un trasplante manipulado permaneció estable a pesar de las ILD administradas.

El quimerismo de los pacientes que recibieron un trasplante con manipulación del inóculo se realizó sobre células nucleadas totales (igual que el no manipulado) y también sobre subpoblaciones linfocitarias (CD3⁺). En esta subpoblación de linfocitos también se mantenía un estado de quimerismo mixto estable.

El trasplante autólogo carece prácticamente de mortalidad relacionada con el trasplante (menos de un 5% en nuestra serie), similar a la registrada en otros estudios pediátricos⁽¹⁴²⁾.

La enfermedad de injerto contra huésped es la complicación con mayor morbilidad del trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico, y constituye la principal causa de mortalidad relacionada con el procedimiento⁽¹⁴³⁾.

Como se ha visto en los resultados de nuestro estudio, la MRT en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, estuvo asociada, sobre todo, a la estrategia de trasplante sin manipulación⁽²⁴⁾. La probabilidad de MRT en esos pacientes se situó en torno al 28%. Estudiando las variables que influían en la probabilidad de MRT en los pacientes de nuestro estudio que recibieron un trasplante alogénico sin manipulación, se observó que la MRT estaba asociada, sobre todo, a la EICH aguda. Presentar EICH aguda incrementó en 30 veces la probabilidad de fallecer por una causa relacionada con el trasplante (MRT). En otros estudios se ha visto como la EICH aguda también asociaba un aumento de mortalidad relacionada con el procedimiento⁽¹⁴³⁻¹⁴⁵⁾.

Algunos estudios han asociado el uso de sangre periférica a un aumento de EICH crónica y de MRT tardía si se compara con el trasplante de progenitores que utiliza médula ósea^(117,129). Eapen realizó un estudio comparativo en niños y adolescentes (entre 8 y 20 años) con leucemias agudas que recibieron un trasplante alogénico familiar sin manipulación utilizando sangre periférica y médula ósea, en la que encontró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a MRT según la fuente utilizada, siendo superior la MRT en los que recibieron un trasplante de sangre periférica (MRT en este grupo de un 26%)⁽¹¹⁷⁾. Los pacientes eran mayores que en nuestra serie, ya que la media de edad en los que recibieron un trasplante con movilización de sangre periférica fue 17 años y con médula ósea 15 años. Al igual que en este estudio, en nuestros pacientes se observa que los pacientes adolescentes y preadolescentes (mayores de 12 años) comparados con el resto de edades, tienen un aumento de la probabilidad de desarrollar EICH aguda, que está fuertemente asociada a la posterior MRT.

Por otro lado existe otro estudio en población pediátrica que también compara el trasplante de donante idéntico familiar la sangre periférica y la médula ósea reflejando una probabilidad de MRT de un 25% (sin encontrar diferencias entre ambas fuentes)⁽¹¹⁸⁾.

La selección CD34⁺ es una estrategia de eliminación de linfocitos T que se utiliza como profilaxis no farmacológica de EICH. La idea de diseñar una estrategia de trasplante que incluya una técnica de este tipo, viene de la necesidad de disminuir la MRT. Como se acaba de exponer, la MRT en el trasplante alogénico está condicionada por el desarrollo de EICH aguda. La manipulación del inóculo resultó efectiva en la prevención de la EICH, ya que se redujo en casi un tercio la probabilidad de desarrollo de EICH aguda en estos pacientes comparados con los que recibieron un trasplante sin manipular. En nuestro estudio se comprobó que el trasplante con eliminación parcial de linfocitos T y ILD posteriores, llevó asociada una MRT mucho menor comparada con el trasplante alogénico sin manipulación^(134,139) y que, prácticamente, la hace equiparable a la MRT del trasplante autólogo.

La MRT del trasplante alogénico de progenitores con manipulación del inóculo fue inferior al 5%. Solo fallecieron 2 pacientes. Ambos pacientes fallecieron por causas infecciosas. Destacar que ningún paciente que recibió un trasplante manipulado falleció como consecuencia de la EICH. También señalar que uno de los dos pacientes que falleció por toxicidad del trasplante era un paciente con Síndrome de Down; como está descrito en la literatura los pacientes con síndrome de Down tienen peores resultados a largo plazo tras el trasplante, por aumento de toxicidad y por aumento de la tasa de recaídas⁽¹⁴⁶⁻¹⁵⁰⁾. Por tanto resulta destacable que si excluimos al paciente que falleció con Síndrome de Down, un único paciente de todos los que recibieron un trasplante alogénico manipulado falleció por un motivo distinto a la recaída.

Aunque el objetivo fundamental de nuestro trabajo es valorar el impacto en la recaída del trasplante alogénico con distintas estrategias, lo más importante en la práctica clínica es la supervivencia libre de eventos en los pacientes; que no recaigan y que no fallezcan por toxicidad del procedimiento.

La SLE de los pacientes tras un trasplante alogénico en nuestro estudio fue casi la mitad. Estos datos son comparables a otras series de adultos y pediátricas que comparan distintos tipos de trasplante^(117,127).

La estrategia de trasplante alogénico manipulado presentó una SLE claramente superior a las otras dos estrategias. Los pacientes que recibieron un trasplante autólogo tuvieron menos SLE porque recayeron más y los que recibieron un trasplante alogénico sin manipulación porque tuvieron más MRT.

En nuestro estudio, la SLE se vio influida por distintas variables; unas son propias del paciente en el momento del trasplante, y otras tienen que ver con la estrategia de trasplante y su evolución posterior. De las propias del paciente: la edad, el género y la fase de enfermedad. La niñas presentaron una SLE de más del doble que los niños. Los pacientes de edades entre 2 y 12 años presentaron una SLE de más del doble comparados con los pacientes de edades más extremas (los lactantes y los adolescentes). Y por último, dentro de las características inherentes al paciente, la fase de enfermedad con la que el paciente llegaba al trasplante; los pacientes que se trasplantaron en fase precoz presentaron más del doble de SLE que los que estaban en una fase avanzada de la enfermedad. El trasplante alogénico es una opción “curativa,” incluso en fase avanzada, ya que consiguió un *plateau*, en casi un tercio de los pacientes. La fase de enfermedad influye directamente en la recaída y por extensión en la SLE como puede comprobarse en muchos estudios⁽¹⁵¹⁾.

En cuanto a los factores dependientes del propio procedimiento de trasplante que influyeron en la SLE en nuestro estudio, se encuentran, por un lado, la estrategia de trasplante alogénico utilizada y por el otro, el posterior desarrollo de la EICH. La SLE fue superior en los pacientes que recibieron un trasplante con eliminación parcial de linfocitos T y con ILD posteriores (lo que denominamos en el estudio trasplante alogénico manipulado), en comparación la no manipulación, siendo la SLE casi 4 veces superior en los que recibieron trasplante alogénico manipulado.

La SLE en nuestra serie también se vio afectada la presencia de EICH, y si se trataba de una EICH aguda o crónica. En el análisis univariado de SLE puede observarse como los pacientes que presentaron EICH aguda presentaron una SLE 3 veces menor comparado con los que no tuvieron EICH aguda. Esto confirma que, la EICH aguda influye de forma muy negativa en la SLE. Sin embargo, los pacientes que desarrollaron manifestaciones de EICH crónica clásica presentaron una probabilidad de SLE superior al 90% (el doble de SLE que los que no presentaron ninguna forma de EICH); que viene a ser un reflejo de la asociación entre el EICL y la EICH crónica.

Estudios que comparan pacientes que reciben trasplante de progenitores hematopoyéticos sin manipulación sitúan la SLE en torno al 50-60%^(24,117,118,127). En nuestra serie este subgrupo presentó una SLE algo menor, influenciada, probablemente por la fase de enfermedad con la que se trasplantaron los pacientes. En estos estudios se comprobó también que la fase de enfermedad en el momento del trasplante y la presencia de EICH influyen en la SLE.

En la estrategia de manipulación la SLE es mayor, gracias a que consigue no aumentar la recaída (potenciando el EICL con la infusión periódica de linfocitos del donante), y sí disminuir la mortalidad tóxica del procedimiento en comparación con el trasplante alogénico sin manipular.

La reconstitución inmune postrasplante es fundamental tanto en el control de infecciones como en el control de la leucemia.

Siendo conscientes de las limitaciones metodológicas de nuestro estudio, observamos, en primer lugar, que, tanto los pacientes que recibieron un trasplante alogénico con manipulación o sin ella, tuvieron una rápida recuperación en el número total de linfocitos T. Esta rápida recuperación puede deberse al uso de sangre periférica movilizada con G-CSF como fuente de progenitores⁽¹¹⁸⁾. En los pacientes que reciben un trasplante con eliminación parcial de linfocitos esta recuperación linfocitaria viene propiciada en parte, por la adición fija de linfocitos T que se hace tras el proceso de selección de CD34⁺ (3x10⁵ linfocitos T/Kg) y en segundo lugar, también está favorecida por las infusiones periódicas de linfocitos del donante en los tiempos establecidos.

En segundo lugar, que la reconstitución de las subpoblaciones linfocitarias es superponible en ambas estrategias de trasplante alogénico, salvo en el periodo postrasplante precoz, donde se observa un menor número de linfocitos T en los trasplantes manipulados. Esta cinética de recuperación inmune tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos con manipulación del inóculo se explica de la siguiente manera: en un primer momento se observa una escasa presencia de linfocitos T en el inóculo, como efecto de la manipulación del inóculo con eliminación parcial de linfocitos T, y después se ve reflejada cómo la infusión posterior de linfocitos del donante soslaya ese déficit en un segundo tiempo⁽¹⁰⁶⁾.

Y por último, observamos cómo un mayor número de células Natural Killer, en el periodo precoz postrasplante (tres meses), estuvo asociado a una mayor probabilidad de recaída. El papel de las células NK en el trasplante HLA no idéntico está muy demostrado⁽¹¹²⁾, sin embargo, en el trasplante HLA idéntico es más controvertido. Resultados preliminares de la Dra. Martínez Romera, sugieren una competencia entre las NK (haplotipo KIR B) y los linfocitos T por los sustratos citoquímicos del medio en el periodo precoz postrasplante⁽¹⁵²⁾.

En resumen, según nuestra experiencia, consideramos que la eliminación parcial de linfocitos T del inóculo con infusiones de linfocitos del donante posteriores permite separar en parte el EICL de la EICH, siendo una estrategia de trasplante a considerar en población pediátrica con hemopatías malignas.

ESTRATEGIAS DE FUTURO

Ahondando en el conocimiento de la biología de las poblaciones linfocitarias, se conoce que la subpoblación de linfocitos T memoria ($45RA^{-}$, RO^{+}) presenta menos capacidad de desarrollar enfermedad de injerto contra huésped y que la población de linfocitos T naïve ($45RA^{+}$) tiene una capacidad mayor para desarrollar EICH.

Actualmente la biotecnología nos permite separar estas poblaciones de linfocitos T para uso clínico.

Por lo tanto, una estrategia de trasplante alogénico con manipulación del inóculo a considerar, podría ser: la realización en primer lugar una selección positiva de $CD34^{+}$ de la aféresis del donante para aislar los progenitores hematopoyéticos, y en segundo lugar, de la fracción negativa obtenida de esa selección realizar una eliminación selectiva de los linfocitos T naïve (selección negativa RA^{+}). Se añadiría esa población de linfocitos no naïve del donante (linfocitos T memoria), con menos capacidad de general EICH al inóculo que contiene los progenitores hematopoyéticos, para infundirlos de manera conjunta el día 0 del trasplante. También se utilizarían estos linfocitos T purificados (sin linfocitos T naïve) en las posteriores infusiones de linfocitos del donante, con objeto de aumentar el efecto injerto contra leucemia sin aumentar la enfermedad de injerto contra huésped⁽¹⁵³⁾.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Existe un efecto injerto contra leucemia en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en pacientes pediátricos, como se ha comprobado por la disminución de la probabilidad de recaída del trasplante alogénico frente al autólogo.
2. La manipulación del inóculo junto con la infusión periódica de linfocitos T del donante posterior, es una estrategia de trasplante alogénico que no se asocia con un aumento de recaídas, es decir mantiene el efecto del injerto contra leucemia, comparada con la estrategia de no manipulación.
3. En el trasplante alogénico existe un efecto injerto contra leucemia unido y separado de la enfermedad de injerto contra huésped crónica. En fase precoz de la enfermedad, la manipulación del inóculo permite separar más estos efectos.
4. La manipulación del inóculo disminuye la probabilidad de desarrollar enfermedad de injerto contra huésped aguda, comparada con la no manipulación; sin encontrar diferencias en la probabilidad de desarrollar enfermedad de injerto contra huésped crónica. La clasificación de la enfermedad de injerto contra huésped propuesta por el *National Institute of Health* identifica mejor el efecto injerto contra leucemia asociado a la enfermedad de injerto contra huésped crónica.
5. En el trasplante alogénico, la mortalidad relacionada con el trasplante, está asociada con la estrategia de trasplante utilizada, y con la presencia de enfermedad de injerto contra huésped aguda. La manipulación del inóculo consigue disminuir la mortalidad relacionada con el trasplante.
6. El trasplante alogénico consigue un “plateau” de supervivencia libre de eventos. Hay variables inherentes a las características del paciente (edad y género) y de su enfermedad (fase de enfermedad), que no son modificables, y otras que sí son susceptibles de cambios con la estrategia de trasplante alogénico utilizado. La manipulación del inóculo aumenta la supervivencia libre de eventos en comparación con el trasplante no manipulado.
7. La cinética de reconstitución inmune es similar en ambas estrategias de trasplante alogénico tras el periodo de postrasplante inmediato. No hemos identificado qué subpoblación linfocitaria se asocia con el efecto injerto contra leucemia dependiente o independiente de la enfermedad de injerto contra huésped crónica. La estrategia de eliminación parcial de linfocitos T del inóculo produce un estado de quimerismo mixto estable, sobre el que administrar infusiones periódicas de linfocitos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England Journal of Medicine* 1957;257:491-6.
2. Mathe G, Jammet H, Pendic B et al. [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. *Revue Francaise d'Etudes Cliniques et Biologiques* 1959;4:226-38.
3. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1977;49:511-33.
4. Snell GD. The Nobel Lectures in Immunology. Lecture for the Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1980: Studies in histocompatibility. *Scandinavian Journal of Immunology* 1992;36:513-26.
5. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lectures* 1966;62:21-78.
6. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Research* 1965;25:1525-31.
7. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematologica* 1958;20:156-66.
8. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 1958;181:1735-6.
9. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *The New England Journal of Medicine* 2000;343:702-9.
10. Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. *The New England Journal of Medicine* 2000;343:782-6.
11. Sevilla J, Gonzalez-Vicent M, Madero L, Garcia-Sanchez F, Diaz MA. Granulocyte colony-stimulating factor alone at 12 microg/kg twice a day for 4 days for peripheral blood progenitor cell priming in pediatric patients. *Bone Marrow Transplantation* 2002;30:417-20.
12. Gonzalez-Vicent M, Madero L, Sevilla J, Ramirez M, Diaz MA. A prospective randomized study of clinical and economic consequences of using G-CSF following autologous peripheral blood progenitor cell (PBPC) transplantation in children. *Bone Marrow Transplantation* 2004;34:1077-81.
13. Madero L, Gonzalez-Vicent M, Ramirez M, Diaz MA. G-CSF-mobilized PBSCT in children with AML in first complete remission. *Bone Marrow Transplantation* 1999;23:975-6.
14. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* 2000;95:3702-9.
15. Korbling M, Freireich EJ. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2011;117:6411-6.
16. Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC et al. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia. *Blood* 2007;110:1397-400.
17. Sevilla J, Diaz MA, Fernandez-Plaza S, Gonzalez-Vicent M, Madero L. Risks and methods for peripheral blood progenitor cell collection in small children. *Transfusion and Apheresis Science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 2004;31:221-31.

18. Sevilla J, Gonzalez-Vicent M, Lassaletta A et al. Peripheral blood progenitor cell collection adverse events for childhood allogeneic donors: variables related to the collection and safety profile. *British Journal of Haematology* 2009;144:909-16.
19. Sevilla J, Gonzalez-Vicent M, Madero L, Diaz MA. Peripheral blood progenitor cell collection in low-weight children. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 2002;11:633-42.
20. Sevilla J, Gonzalez-Vicent M, Madero L, Garcia-Sanchez F, Angel Diaz M. Large volume leukapheresis in small children: safety profile and variables affecting peripheral blood progenitor cell collection. *Bone Marrow Transplantation* 2003;31:263-7.
21. Sevilla J, Plaza SF, Gonzalez-Vicent M et al. PBSC collection in extremely low weight infants: a single-center experience. *Cytotherapy* 2007;9:356-61.
22. Benito AI, Gonzalez-Vicent M, Garcia F et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) from HLA-identical sibling donors in children with hematological diseases: a single center pilot study. *Bone Marrow Transplantation* 2001;28:537-43.
23. Gonzalez-Vicent M, Diaz MA. Higher doses of CD34+ PBPC are associated with a rapid acquisition of full donor chimerism and lower risk of relapse after allogeneic transplantation in pediatric patients with hematological malignancies. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2011;33:185-9.
24. Diaz MA, Gonzalez-Vicent M, Gonzalez ME et al. Long-term outcome of allogeneic PBSC transplantation in pediatric patients with hematological malignancies: a report of the Spanish Working Party for Blood and Marrow Transplantation in Children (GETMON) and the Spanish Group for Allogeneic Peripheral Blood Transplantation (GETH). *Bone Marrow Transplantation* 2005;36:781-5.
25. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England Journal of Medicine* 1989;321:1174-8.
26. Gluckman E, Ruggeri A, Volt F, Cunha R, Boudjedir K, Rocha V. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *British Journal of Haematology* 2011;154:441-7.
27. Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *The New England Journal of Medicine* 2000;342:1846-54.
28. Diaz MA, Gonzalez-Vicent M, Ramirez M et al. Allogeneic cord blood transplantation in children with hematological malignancies: a long-term follow-up single-center study. *Pediatric Hematology and Oncology* 2009;26:165-74.
29. Benito AI, Diaz MA, Gonzalez-Vicent M, Sevilla J, Madero L. Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical results. *Bone Marrow Transplantation* 2004;33:675-90.
30. Gonzalez-Vicent M, Diaz MA. Unrelated cord blood transplantation in adolescent and young adults with hematologic malignancies. *Leukemia Research* 2012;36:123-4.
31. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2009;15:1628-33.
32. Santos GW, Tutschka PJ, Broxmeyer R et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *The New England Journal of Medicine* 1983;309:1347-53.
33. Mulcahy Levy JM, Tello T, Giller R et al. Late effects of total body irradiation and hematopoietic stem cell transplant in children under 3 years of age. *Pediatric Blood & Cancer* 2013;60:700-4.

34. Sanders JE. Late effects in children receiving total body irradiation for bone marrow transplantation. *Radiotherapy and Oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 1990;18 Suppl 1:82-7.
35. Satwani P, Cooper N, Rao K, Veys P, Amrolia P. Reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation in childhood malignant and nonmalignant diseases. *Bone Marrow Transplantation* 2008;41:173-82.
36. Slavin S, Nagler A, Naparstek E et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;91:756-63.
37. Verneris MR, Eapen M, Duerst R et al. Reduced-intensity conditioning regimens for allogeneic transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2010;16:1237-44.
38. Bitan M, He W, Zhang MJ et al. Transplantation for children with acute myeloid leukemia: a comparison of outcomes with reduced intensity and myeloablative regimens. *Blood* 2014;123:1615-20.
39. Del Toro G, Satwani P, Harrison L et al. A pilot study of reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation from unrelated cord blood and matched family donors in children and adolescent recipients. *Bone Marrow Transplantation* 2004;33:613-22.
40. van Dicke KAHJI, van Bekkum DW. The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures. II. Mouse spleen cell fractionation on a discontinuous albumin gradient. *Transplantation* 1968;6:562-70.
41. Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001;98:3192-204.
42. Watts MJ, Somervaille TC, Ings SJ et al. Variable product purity and functional capacity after CD34 selection: a direct comparison of the CliniMACS (v2.1) and Isolex 300i (v2.5) clinical scale devices. *British Journal of Haematology* 2002;118:117-23.
43. Urbano-Ispizua A, Rozman C, Pimentel P et al. The number of donor CD3(+) cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34(+) selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings. *Blood* 2001;97:383-7.
44. Lang P, Teltschik HM, Feuchtinger T et al. Transplantation of CD3/CD19 depleted allografts from haploidentical family donors in paediatric leukaemia. *British Journal of Haematology* 2014;165:688-98.
45. Gonzalez-Llano O, Rodriguez-Romo LN, Mancias-Guerra Mdel C et al. Feasibility of an outpatient HLA haploidentical stem cell transplantation program in children using a reduced-intensity conditioning regimen and CD3-CD19 depletion. *Hematology* 2014;19:10-7.
46. Schumm M, Lang P, Bethge W et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy* 2013;15:1253-8.
47. Lang P, Schumm M, Taylor G et al. Clinical scale isolation of highly purified peripheral CD34+progenitors for autologous and allogeneic transplantation in children. *Bone Marrow Transplantation* 1999;24:583-9.
48. Handgretinger R, Lang P, Schumm M et al. Isolation and transplantation of autologous peripheral CD34+ progenitor cells highly purified by magnetic-activated cell sorting. *Bone Marrow Transplantation* 1998;21:987-93.
49. Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplantation* 2001;27:777-83.

50. Lang P, Handgretinger R, Niethammer D et al. Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood* 2003;101:1630-6.
51. El-Cheikh J, Vazquez A, Crocchiolo R et al. Acute GVHD is a strong predictor of full donor CD3+ T cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *American Journal of Hematology* 2012;87:1074-8.
52. Lassaletta A, Ramirez M, Montero JM et al. Full donor chimerism by day 30 after allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation is associated with a low risk of relapse in pediatric patients with hematological malignancies. *Leukemia* 2005;19:504-6.
53. Minculescu L, Madsen HO, Sengelov H. T-cell chimerism is valuable in predicting early mortality in steroid-resistant acute graft-versus-host disease after myeloablative allogeneic cell transplantation. *Acta Haematologica* 2014;132:187-92.
54. Balon J, Halaburda K, Bieniaszewska M et al. Early complete donor hematopoietic chimerism in peripheral blood indicates the risk of extensive graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation* 2005;35:1083-8.
55. Nasilowska-Adamska B, Majewski M, Seferynska I et al. Predictive value of RT-PCR PML-RARA transcript monitoring for extramedullary relapse of acute promyelocytic leukemia in the pleura, heart and pericardium after allogeneic SCT. *Annals of Transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society* 2007;12:33-8.
56. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation* 2005;35:107-19.
57. Lion T. Summary: reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection. *Leukemia* 2003;17:252-4.
58. Billingham RE. Reactions of grafts against their hosts. *Science* 1959;130:947-53.
59. Billingham RE, Brent L, Brown JB, Medawar PB. Time of onset and duration of transplantation immunity. *Transplantation Bulletin* 1959;6:410-4.
60. Ferrara J, Mauch P, Murphy G, Burakoff SJ. Bone marrow transplantation: the genetic and cellular basis of resistance to engraftment and acute graft-versus-host disease. *Survey of Immunologic Research* 1985;4:253-63.
61. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 1999;5:347-56.
62. Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Seminars in Hematology* 2006;43:3-10.
63. Paris F, Fuks Z, Kang A et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001;293:293-7.
64. Gale RP, Bortin MM, van Bekkum DW et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology* 1987;67:397-406.
65. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European Journal of Immunology* 2000;30:1538-43.
66. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annual Review of Immunology* 2007;25:139-70.
67. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nature Medicine* 1997;3:409-13.
68. Piguet PF, Grau GE, Allet B, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *The Journal of Experimental Medicine* 1987;166:1280-9.

69. Abhyankar S, Gilliland DG, Ferrara JL. Interleukin-1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft versus host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 1993;56:1518-23.
70. Nestel FP, Greene RN, Kichian K, Ponka P, Lapp WS. Activation of macrophage cytostatic effector mechanisms during acute graft-versus-host disease: release of intracellular iron and nitric oxide-mediated cytostasis. *Blood* 2000;96:1836-43.
71. Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, Lapp WS. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *The Journal of Experimental Medicine* 1992;175:405-13.
72. Patriarca F, Skert C, Sperotto A et al. The development of autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation is related with chronic graft-vs-host disease and immune recovery. *Experimental Hematology* 2006;34:389-96.
73. Ellison CA, Bradley DS, Fischer JM, Hayglass KT, Gartner JG. Murine graft-versus-host disease induced using interferon-gamma-deficient grafts features antibodies to double-stranded DNA, T helper 2-type cytokines and hypereosinophilia. *Immunology* 2002;105:63-72.
74. Zorn E, Kim HT, Lee SJ et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903-11.
75. Brochu S, Rioux-Masse B, Roy J, Roy DC, Perreault C. Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease. *Blood* 1999;94:390-400.
76. Zaja F, Bacigalupo A, Patriarca F et al. Treatment of refractory chronic GVHD with rituximab: a GITMO study. *Bone Marrow Transplantation* 2007;40:273-7.
77. Miklos DB, Kim HT, Miller KH et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* 2005;105:2973-8.
78. Tivol E, Komorowski R, Drobycki WR. Emergent autoimmunity in graft-versus-host disease. *Blood* 2005;105:4885-91.
79. Glucksberg H, Storb R, Fefer A et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295-304.
80. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *The American Journal of Medicine* 1980;69:204-17.
81. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers ME. Chronic graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2003;9:215-33.
82. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2005;11:945-56.
83. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *The New England Journal of Medicine* 1995;332:217-23.
84. Apperley JF, Jones L, Hale G et al. Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse. *Bone Marrow Transplantation* 1986;1:53-66.

85. Fefer A, Sullivan KM, Weiden P et al. Graft versus leukemia effect in man: the relapse rate of acute leukemia is lower after allogeneic than after syngeneic marrow transplantation. *Progress in Clinical and Biological Research* 1987;244:401-8.
86. Falkenburg JH, van de Corput L, Marijt EW, Willemze R. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Experimental Hematology* 2003;31:743-51.
87. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *British Medical Journal* 1956;2:626-7.
88. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *The New England Journal of Medicine* 1979;300:1068-73.
89. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555-62.
90. Barrett AJ. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *British Journal of Haematology* 2008;142:877-88.
91. Savani BN, Mielke S, Adams S et al. Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2007;21:2145-52.
92. Falkenburg JH, Marijt WA, Heemskerk MH, Willemze R. Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions. *Current Opinion in Hematology* 2002;9:497-502.
93. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76:2462-5.
94. Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004;103:767-76.
95. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008;112:4371-83.
96. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nature Reviews Cancer* 2004;4:371-80.
97. Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treatment Reviews* 2010;36:528-38.
98. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995;86:2041-50.
99. Slavin S, Nagler A, Shapira MY, Aker M, Gabriel C, Or R. Treatment of leukemia by alloreactive lymphocytes and nonmyeloablative stem cell transplantation. *Journal of Clinical Immunology* 2002;22:64-9.
100. Marks DI, Lush R, Cavenagh J et al. The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002;100:3108-14.
101. Keil F, Haas OA, Fritsch G et al. Donor leukocyte infusion for leukemic relapse after allogeneic marrow transplantation: lack of residual donor hematopoiesis predicts aplasia. *Blood* 1997;89:3113-7.
102. Schaap N, Schattenberg A, Bar B, Preijers F, van de Wiel van Kemenade E, de Witte T. Induction of graft-versus-leukemia to prevent relapse after partially lymphocyte-depleted allogeneic bone marrow transplantation by pre-emptive donor leukocyte infusions. *Leukemia* 2001;15:1339-46.
103. Liga M, Triantafyllou E, Tiniakou M et al. High alloreactivity of low-dose prophylactic donor lymphocyte infusion in patients with acute leukemia undergoing allogeneic

- hematopoietic cell transplantation with an alemtuzumab-containing conditioning regimen. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2013;19:75-81.
104. Rettinger E, Willasch AM, Kreyenberg H et al. Preemptive immunotherapy in childhood acute myeloid leukemia for patients showing evidence of mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2011;118:5681-8.
 105. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W et al. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *Journal of Clinical Oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004;22:1696-705.
 106. Perez A, Gonzalez-Vicent M, Ramirez M, Sevilla J, Madero L, Diaz MA. Intentional induction of mixed haematopoietic chimerism as platform for cellular therapy after HLA-matched allogeneic stem cell transplantation in childhood leukaemia patients. *British Journal of Haematology* 2008;140:340-3.
 107. Rujkijyanont P, Morris C, Kang G et al. Risk-adapted donor lymphocyte infusion based on chimerism and donor source in pediatric leukemia. *Blood Cancer Journal* 2013;3:e137.
 108. Levine JE, Barrett AJ, Zhang MJ et al. Donor leukocyte infusions to treat hematologic malignancy relapse following allo-SCT in a pediatric population. *Bone Marrow Transplantation* 2008;42:201-5.
 109. Horn B, Petrovic A, Wahlstrom J et al. Chimerism-based pre-emptive immunotherapy with fast withdrawal of immunosuppression and donor lymphocyte infusions after allogeneic stem cell transplantation for pediatric hematologic malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2015;21:729-37.
 110. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 2010;115:3861-8.
 111. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001;97:1458-66.
 112. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-100.
 113. Corre E, Carmagnat M, Busson M et al. Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: B-cell deficiency is associated with late infections. *Haematologica* 2010;95:1025-9.
 114. Clavert A, Chevallier P, Guillaume T et al. Safety and efficacy of rituximab in steroid-refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplantation* 2013;48:734-6.
 115. Solomon SR, Sizemore CA, Ridgeway M et al. Corticosteroid-Free Primary Treatment of Chronic Extensive Graft-versus-Host Disease Incorporating Rituximab. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2015.
 116. Cho BS, Lee SE, Song HH et al. Graft-versus-tumor effect according to type of graft-versus-host disease defined by National Institutes of Health consensus criteria and associated outcomes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2012;18:1136-43.
 117. Eapen M, Horowitz MM, Klein JP et al. Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *Journal of Clinical Oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004;22:4872-80.

118. Vicent MG, Madero L, Ortega JJ et al. Matched-pair analysis comparing allogeneic PBCT and BMT from HLA-identical relatives in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 2002;30:9-13.
119. Majhail NS, Brazauskas R, Hassebroek A et al. Outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation for adolescent and young adults compared with children and older adults with acute myeloid leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2012;18:861-73.
120. Tracey J, Zhang MJ, Thiel E, Sobocinski KA, Eapen M. Transplantation conditioning regimens and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2013;19:255-9.
121. Gupta V, Richards S, Rowe J, Acute Leukemia Stem Cell Transplantation Trialists' Collaborative G. Allogeneic, but not autologous, hematopoietic cell transplantation improves survival only among younger adults with acute lymphoblastic leukemia in first remission: an individual patient data meta-analysis. *Blood* 2013;121:339-50.
122. Committee AE. The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of acute lymphoblastic leukemia in children. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2006;12:370-1.
123. Davies SM, Rowe JM, Appelbaum FR. Indications for hematopoietic cell transplantation in acute leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2008;14:154-64.
124. Cornelissen JJ, Versluis J, Passweg JR et al. Comparative therapeutic value of post-remission approaches in patients with acute myeloid leukemia aged 40-60 years. *Leukemia* 2015;29:1041-50.
125. Badell I, Ortega JJ, Munoz A et al. [Allogenic bone marrow transplantation versus autograft in acute lymphoblastic leukemia, in second remission in 113 children. Results of the Grupo Espanol de Transplante de Medula Ninos (GETMON)]. *Sangre* 1996;41:101-8.
126. Petersen SL. Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Danish Medical Bulletin* 2007;54:112-39.
127. Stern M, de Wreede LC, Brand R et al. Sensitivity of hematological malignancies to graft-versus-host effects: an EBMT megafile analysis. *Leukemia* 2014;28:2235-40.
128. Montero A, Savani BN, Shenoy A et al. T-cell depleted peripheral blood stem cell allotransplantation with T-cell add-back for patients with hematological malignancies: effect of chronic GVHD on outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2006;12:1318-25.
129. Weisdorf D, Zhang MJ, Arora M, Horowitz MM, Rizzo JD, Eapen M. Graft-versus-host disease induced graft-versus-leukemia effect: greater impact on relapse and disease-free survival after reduced intensity conditioning. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2012;18:1727-33.
130. Inagaki J, Moritake H, Nishikawa T et al. Long-term morbidity and mortality in children with chronic graft-versus-host disease classified by National Institutes of Health consensus criteria after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2015.

131. Chang YJ, Huang XJ. Donor lymphocyte infusions for relapse after allogeneic transplantation: when, if and for whom? *Blood Reviews* 2013;27:55-62.
132. LaBelle JL, Cunningham JM. Stem cell transplant as an immunomodulatory tool for children with hematologic malignancies. *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting* 2013.
133. Booth C, Lawson S, Veys P. The current role of T cell depletion in paediatric stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* 2013;162:177-90.
134. Nakamura R, Bahceci E, Read EJ et al. Transplant dose of CD34(+) and CD3(+) cells predicts outcome in patients with haematological malignancies undergoing T cell-depleted peripheral blood stem cell transplants with delayed donor lymphocyte add-back. *British Journal of Haematology* 2001;115:95-104.
135. Baron F, Beguin Y. Preemptive cellular immunotherapy after T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2002;8:351-9.
136. Dvorak CC, Gilman AL, Horn B et al. Clinical and immunologic outcomes following haplocompatible donor lymphocyte infusions. *Bone Marrow Transplantation* 2009;44:805-12.
137. Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. *Blood* 2002;100:1903-9.
138. Mapara MY, Kim YM, Marx J, Sykes M. Donor lymphocyte infusion-mediated graft-versus-leukemia effects in mixed chimeras established with a nonmyeloablative conditioning regimen: extinction of graft-versus-leukemia effects after conversion to full donor chimerism. *Transplantation* 2003;76:297-305.
139. Spitzer TR, McAfee S, Sackstein R et al. Intentional induction of mixed chimerism and achievement of antitumor responses after nonmyeloablative conditioning therapy and HLA-matched donor bone marrow transplantation for refractory hematologic malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2000;6:309-20.
140. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W et al. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplantation* 2004;33:815-21.
141. Klingebiel T, Bader P, Party EPW. Delayed lymphocyte infusion in children given SCT. *Bone Marrow Transplantation* 2008;41 Suppl 2:S23-6.
142. Foncillas MA, Diaz MA, Sevilla J et al. Engraftment syndrome emerges as the main cause of transplant-related mortality in pediatric patients receiving autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2004;26:492-6.
143. Brown RA, Adkins D, Khoury H et al. Long-term follow-up of high-risk allogeneic peripheral-blood stem-cell transplant recipients: graft-versus-host disease and transplant-related mortality. *Journal of Clinical Oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999;17:806-12.
144. MacMillan ML, Robin M, Harris AC et al. A refined risk score for acute graft-versus-host disease that predicts response to initial therapy, survival, and transplant-related mortality. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2015;21:761-7.
145. Ponce DM, Hilden P, Mumaw C et al. High day 28 ST2 levels predict for acute graft-versus-host disease and transplant-related mortality after cord blood transplantation. *Blood* 2015;125:199-205.

146. Hitzler JK, He W, Doyle J et al. Outcome of transplantation for acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome. *Pediatric Blood & Cancer* 2014;61:1126-8.
147. Hitzler JK, He W, Doyle J et al. Outcome of transplantation for acute myelogenous leukemia in children with Down syndrome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2013;19:893-7.
148. Meyr F, Escherich G, Mann G et al. Outcomes of treatment for relapsed acute lymphoblastic leukaemia in children with Down syndrome. *British Journal of Haematology* 2013;162:98-106.
149. Maloney KW. Acute lymphoblastic leukaemia in children with Down syndrome: an updated review. *British Journal of Haematology* 2011;155:420-5.
150. Rubin CM, Mick R, Johnson FL. Bone marrow transplantation for the treatment of haematological disorders in Down's syndrome: toxicity and outcome. *Bone Marrow Transplantation* 1996;18:533-40.
151. Watanabe T, Takaue Y, Kawano Y et al. HLA-identical sibling peripheral blood stem cell transplantation in children and adolescents. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2002;8:26-31.
152. Martínez Romera I, Valentín J, Fernández L, Díaz MA, Pérez A. (2015). "Papel pronóstico de los genes KIR en la evolución postrasplante alogénico familiar idéntico en paciente con leucemia aguda" en VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica. Barcelona. Disponible en http://www.geyseco.es/sehop2015/documentos/libro_abstracts.pdf
153. Bleakley M, Heimfeld S, Loeb KR et al. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell-depleted stem cell grafts. *The Journal of Clinical Investigation* 2015;125:2677-89.

ANEXO

ANEXO

1. LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo: Anticuerpo monoclonal
 ADN: Ácido desoxirribonucleico
 APC: Célula presentadora de antígeno
 Blr: Bilirrubina
 BO: Bronquiolitis obliterante
 BONO: Bronquiolitis obliterante con neumonía organizada
 CMN: Células mononucleadas
 CM: Memoria central
 CMV: Citomegalovirus
 CNT: Células nucleadas totales
 CTCM: Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid
 DMSO: Dimetilsulfóxido
 EBMT: Sociedad europea de trasplante de sangre y médula ósea
 EICH: Enfermedad de injerto contra huésped
 EICL: Efecto de injerto contra leucemia
 ELT: Eliminación de Linfocitos T
 EM: Memoria efector
 EMR: Enfermedad residual mínima
 FA: Fosfatasa alcalina
 FEV₁: Volumen espirado máximo en el primer segundo de la espiración forzada
 FISH: Hibridación fluorescente *in situ*
 G-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas
 GETH: Grupo español de trasplante hematopoyético y terapia celular
 GOT: Transaminasa glutámico oxalacética
 GPT: Transaminasa glutámico pirúvica
 GGT: Gamma glutamil transpeptidasa
 HLA: Complejo mayor de histocompatibilidad humano
 IBMTR: Registro internacional de trasplante de médula ósea
 Ig: Inmunoglobulina
 IL: Interleuquina
 ILD: Infusión de linfocitos del donante
 INF: Interferón
 JACIE: Joint Accreditation Committee-ISCT and EBMT
 KIR: receptor de la NK
 LLA: Leucemia linfoblástica aguda
 LMA: Leucemia mieloblástica aguda
 LMC: Leucemia mieloide crónica
 LMMJ: Leucemia mielomonocítica crónica juvenil
 LB: Linfocito B
 LTc: Linfocito T citotóxico
 LT: Linfocito T

LTh: Linfocito T colaborador
 LPS: Lipopolisacárido
 MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
 MRT: Mortalidad Relacionada con el Trasplante
 MO: Médula ósea
 NIH: Instituto de Salud Nacional Norteamericano
 NK: Célula Natural Killer
 NO: Óxido Nítrico
 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
 RFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
 RIC: Acondicionamiento de intensidad reducida
 RR: Riesgo Relativo
 RTE: Linfocitos T recién salidos del timo
 SCU: Sangre de cordón umbilical
 SLE: Supervivencia libre de enfermedad
 SLP: Síndrome linfoproliferativo
 SNP: Polimorfismo de nucleótido simple
 SP: Sangre periférica
 STR: Microsatélite
 TCR: Receptor del linfocito T
 TGF: Factor crecimiento tumoral
 TNF: Factor de necrosis tumoral
 TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos
 Treg: Linfocito T regulador
 VEB: Virus Ebstein-Barr
 7-AAD: 7- Amino-ActinomicinaD

2. TABLAS ANEXAS

Tabla anexa 1. Escala funcional Lansky

Puntuación	Descripción
100	Plenamente activo, normal
90	Limitación mínima en actividades físicas extenuantes
80	Activo, pero se cansa más rápidamente en juegos extenuantes
70	Juega menos o dedica menos tiempo a juegos activos
60	Encamado hasta el 50% del día, muy pocos juegos activos con asistencia y supervisión
50	Precisa considerable asistencia para cualquier juego activo; es capaz de participar en juegos reposados
40	Pasa la mayor parte del día en la cama; capaz de iniciar actividades reposadas
30	Frecuentemente dormido; precisa notable ayuda para realizar actividades reposadas
20	No juega; no se levanta de la cama; participación pasiva (mirar TV, etc)
10	No responde a estímulos
0	Exitus

Tabla anexa 2. Índice de Karnofsky

Puntuación	Descripción
100	Asintomático
90	Mínima sintomatología, tolera actividad laboral normal
80	Algunos síntomas, actividad normal con esfuerzo
70	Incapaz de actividad normal, pero se vale por si mismo
60	Requiere ocasional ayuda para sus necesidades básicas
50	Requiere frecuente asistencia y atención médica
40	Incapacitado, precisa atenciones especiales
30	Gravemente incapacitado, requiere hospitalización
20	Requiere hospitalización y tratamiento
10	Evolución rápidamente fatal
0	Exitus

